

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DEGRADACIÓN DE DISCOS COMPACTOS POR
UN ANAMORFO DE “BJERKANDERA ADUSTA”:
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y
MOLECULAR DE UNA ARIL-ALCOHOL
OXIDASA CON NUEVAS PROPIEDADES
CATALÍTICAS.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Elvira Romero Guzmán

Bajo la dirección de la doctora

M^a Jesús Martínez Hernández

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-9253-9

© Elvira Romero Guzmán, 2010

DEGRADACIÓN DE DISCOS COMPACTOS POR UN ANAMORFO DE *Bjerkandera adusta*: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE UNA ARIL-ALCOHOL OXIDASA CON NUEVAS PROPIEDADES CATALÍTICAS

Memoria para optar al grado de Doctora por la
Universidad Complutense de Madrid presentada por:

ELVIRA ROMERO GUZMÁN

DIRECTORA:

Dra. M^a Jesús Martínez Hernández

Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

TUTORA:

Dra. Covadonga Vázquez Estévez

Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID



Madrid, 2010

A mis padres y hermanas

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid y, durante una estancia predoctoral, en el *Internationales Hochschulinstitut Zittau* en Alemania. La financiación se ha obtenido de una beca de postgrado del CSIC con la colaboración de la empresa *Bayer* (I3P-BPG2002) y de una beca predoctoral I3P del CSIC (I3P-BPD2003-2).

Antes de poner el punto y final a este trabajo me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido de diferentes formas:

A la Dra. M^a Jesús Martínez, directora de esta Tesis, por hacerme un sitio en su grupo de investigación, por su cercanía y buena disposición y por confiar en mí y apoyarme hasta el final.

Al Dr. Ángel T. Martínez, principalmente por su ayuda con un artículo que nos dio mucho trabajo.

A la Dra. Covadonga Vázquez, tutora de esta Tesis, y a la Dra. M^a José Valderrama, coordinadora del Dpto. de Microbiología III de la Universidad Complutense de Madrid, por facilitarme los trámites burocráticos.

Al Dr. Martin Hofrichter, por aceptarme, durante una estancia predoctoral, en su grupo de investigación y por facilitarme su financiación.

A la Dra. Juana Rodríguez y al Dr. Manuel Hernández, por hacerme un sitio, durante mis últimos años de carrera, en el laboratorio del Dpto. de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá de Henares, así como por dedicarme su tiempo y por su afabilidad. Del mismo Dpto., también guardo un grato recuerdo de la Dra. Nardy del Valle y la Dra. M^a Enriqueta Arias, que me ayudaron de diferentes formas, así como del Dr. Francisco Guillén, que realizó las primeras “disecciones” a las AAO en el CIB y cuyos estudios han servido de base para esta Tesis Doctoral.

A la Dra. M^a Isabel Pérez, por ser la responsable de que yo acabara en el CIB, por los buenos ratos que pasamos durante su sabático y por su alegría contagiosa.

Al Dr. Javier García-Guinea, por compartir con nosotros el disco compacto del que se aisló el hongo que se ha estudiado en esta Tesis, así como a Víctor Cárdenes por traer este disco de Belice.

A la Dra. Alicia Prieto y a la Dra. Vivian de los Ríos por los análisis de espectrometría de masas, a Octavio Cadenilla por los análisis de espectrometría de emisión óptica, a Laura Tormo por los análisis de microscopia electrónica y a

Mónica Fontenla y Pablo Jalón por su ayuda con la portada y por realizar varias fotografías de esta Tesis, así como a otras personas que trabajan en diferentes servicios del CIB (biblioteca, técnico, química de proteínas, secuenciación de ADN...) y que han facilitado mi trabajo durante estos años.

A la Dra. Alicia Prieto también le agradezco su afabilidad y buena disposición y, al igual que a la Dra. Susana Camarero, que haya compartido conmigo su despacho durante la escritura de esta Tesis.

A mis compañeros de laboratorio en el CIB, por su ayuda con el trabajo y por hacerlo más divertido. A María, por ayudarme en mis inicios con la biología molecular y en las cinéticas y por los ratos tan buenos que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio. A Javi, Susana, Quique, Isa, David, Patricia, Olga, Marta, Mariela y M^a José, que ya estaban el primer día que llegué al CIB, me han ayudado siempre que lo he necesitado y con ellos tengo tantas anécdotas divertidas como para escribir otra Tesis. A Patricia, tengo que agradecerle especialmente su ayuda con las cinéticas bisustrato y por compartir conmigo algunos de sus conocimientos sobre las flavoenzimas. A Javi, su ayuda en mis inicios con la biología molecular. Ellos me vieron llegar a mí al CIB, pero después yo he visto llegar a otros muchos cargados de energía y buenas ideas, con los que también he pasado muy buenos ratos y que me han ayudado con el trabajo diario: Ana, Víctor, Ángeles, Eva, Bea, Aitor, Yuta, Davinia, Miguel, Elena, Vero, Mariu, Craig e Isabel. Además, han sido muchos los que han realizado estancias cortas con nosotros (y algunos no tan cortas), que nos han ayudado a romper la monotonía y nos han enseñado cosas nuevas: Rober, Celia, Adrián, Mario, Bea, Javi, Giusy, Pili, Miriam, Ana, Rosario, José María, Lola, Debora, Elda, Atef, Houde, Hanen, Hela, Tahar, Kari, Holger...

A mis compañeros de laboratorio en la universidad de Zittau, René, Matthias, Christiane, Martin..., por ayudarme con el trabajo y por los buenos ratos dentro y fuera del laboratorio. Anke, Maik y Dominik espero que sigáis pensando que *alles ist möglich!*

A mis compañeros de la carrera, María, Pili, Dani, Jorge, Julia, Alberto, Víctor, Cesar, Macarena, Eva, Jhony, Brilly, Conchi e Inma, por los buenos ratos del merendero y por todo lo demás.

A Sandra, Marisa, Elena y Pili, por ser tan buenas amigas y por rescatarme del trabajo y ¡hacerme pasar los ratos más divertidos! A todos los demás amigos del barrio y de las vacaciones ibicencas y a Tron ¡por lo bien que lo pasamos y por lo que nos queda!

A toda mi familia, que siempre se han preocupado por mí y por mi “hongui”, empezando por los abuelos y acabando por los primos. A mis padres, porque han dedicado mucho tiempo y esfuerzo para que mis hermanas y yo pudiéramos alcanzar nuestros objetivos y por lo mucho que nos quieren. A mis hermanas, Olaya y Victoria, porque son el regalo más valioso que me han hecho y porque siempre me apoyan y comparto con ellas muy buenos ratos.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A	Absorbancia
A/S	Concentración de sustrato orgánico
aa	Aminoácido
Ala/A	Alanina
Arg/R	Arginina
Asn/N	Asparagina
Asp/D	Ácido aspártico
Cys/C	Cisteína
Gln/Q	Glutamina
Glu/E	Ácido glutámico
Gly/G	Glicina
His/H	Histidina
Ile/I	Isoleucina
Leu/L	Leucina
Lys/K	Lisina
Met/M	Metionina
Phe/F	Fenilalanina
Pro/P	Prolina
Ser/S	Serina
Thr/T	Treonina
Trp/W	Triptófano
Tyr/Y	Tirosina
Val/V	Valina
AAD	Aril-alcohol deshidrogenasa
AAO	Aril-alcohol oxidasa
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN_c	ADN copia
ADP	Adenosín difosfato
Amp	Ampicilina
AN	Apertura numérica
ANOVA	Análisis de varianza (<i>analysis of variance</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_m	ARN mensajero
B	Concentración de O ₂
b	Base
A	Adenina
C	Citosina
D	G/A/T
G	Guanina
N	A/C/G/T
R	A/G
T	Timina
Y	C/T
BD	Disco <i>Blu-Ray</i> (<i>Blu-Ray disc</i>)
BPA	Bisfenol A

BSA	Albúmina de suero bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
c	Concentración
CAS	Registro de sustancias químicas (<i>Chemical Abstracts Service</i>)
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CD	Disco compacto (<i>compact disc</i>)
CD-A	CD audio (<i>audio CD</i>)
CD-R	CD-grabable (<i>CD-recordable</i>)
CD-ROM	CD-memoria de sólo lectura (<i>CD-read only memory</i>)
CD-RW	CD-regrabable (<i>CD-rewritable</i>)
CH	Contenido en carbohidratos
C-I	Compuesto-I
C-II	Compuesto-II
CT	Banda de transferencia de carga
d	Distancia migrada por la proteína
D	Cebador degenerado
DBM	Motivo conservado de unión a dinucleótido (<i>dinucleotide-binding motif</i>)
DMP	2,6-Dimetoxifenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DVD	Disco versátil digital (<i>digital versatile disc</i>)
DyP	Peroxidasa decolorante de tintes (<i>dye-decolorizing peroxidase</i>)
E	Potencial redox
EC	Número de identificación de la enzima (<i>enzyme commission number</i>)
EDTA	Ácido etilen-diaminotetraacético
Endo H	Endo- β -N-acetilglucosaminidasa H
ER	Estado de reposo
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
G	Unidad guayacilpropano
GB	<i>Gigabyte</i>
GMC	Glucosa-metanol-colina
H	Unidad <i>p</i> -hidroxifenilpropano
HD-DVD	DVD-alta definición (<i>high definition-DVD</i>)
HEPES	Ácido <i>N</i> -2-hidroxietilpiperacina- <i>N'</i> -2-etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>high performance liquid chromatography</i>)
hq	Hidroquinona
HRP	Peroxidasa de rábano picante (<i>horseradish peroxidase</i>)
I	Concentración de inhibidor
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (<i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
IJFM	Instituto Jaime Ferrán de Microbiología
IPTG	Isopropil- β -D-tio-galactósido
ITS	Espaciador transcribible interno (<i>internal transcribed spacer</i>)
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
K^A	Constante de disociación de <i>A</i>

K_m^A	Constante de Michaelis-Menten de <i>A</i>
K_m^B	Constante de Michaelis-Menten de <i>B</i>
k_{cat}	Constante catalítica
k_{cat}/K_m	Eficiencia catalítica
K_i	Constante de inhibición
K_m	Constante de Michaelis-Menten
<i>L</i>	Cadenas adicionales de lignina
<i>l</i>	Paso óptico
LB	Luria-Bertani
LiP	Lignina peroxidasa
M	Masa molecular
MALDI-TOF	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz con un analizador tiempo de vuelo (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight</i>)
MB	<i>Megabyte</i>
MnP	Manganeso peroxidasa
MOPS	Ácido <i>p</i> -morfolino propano sulfónico
MR	Refractividad molar (<i>molar refractivity</i>)
MRE	Elemento de respuesta a metales (<i>metal regulatory element</i>)
N. d.	No determinado
NAD	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NADP	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato
nt	Nucleótido
ORF	Marco abierto de lectura (<i>open reading frame</i>)
ox	Estado oxidado
P	Porfirina
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>Protein data bank</i>
pI	Punto isoeléctrico
PIPES	Ácido piperacín- <i>N,N'</i> -bis(2-etanosulfónico)
pNPB	Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo
QR	Quinona reductasa
QSAR	Relación cuantitativa estructura-actividad (<i>quantitative structure-activity relationships</i>)
RACE	Amplificación rápida de extremos de ADN _c (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>)
RB5	<i>Reactive black 5</i>
<i>R_f</i>	Distancia migrada por la proteína/distancia migrada por colorante
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa (<i>reverse transcriptase</i>)
S	Unidad siringilpropano
SACD	CD audio súper (<i>super audio CD</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>scanning electron microscopy</i>)
SOB	Caldo óptimo súper (<i>super optimal broth</i>)

SP	Cebador específico
sq	Semiquinona
SR	Sustancias reductoras
SSP-PCR	PCR con un único cebador específico (<i>single-specific-primer</i> PCR)
<i>t</i>	Tiempo/ tonelada
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetrametiletilendiamina
<i>T_h</i>	Temperatura de hibridación
<i>T_m</i>	Temperatura de fusión
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad enzimática
UTR	Región no traducida (<i>unstranlated region</i>)
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V	Voltio
<i>v</i>	Velocidad inicial
VP	Peroxidasa versátil
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido
ϵ	Coefficiente de extinción molar
λ	Longitud de onda

RESUMEN

Los hongos son eucariotas heterótrofos capaces de colonizar gran diversidad de ambientes. Algunos de estos organismos participan en la descomposición de la materia orgánica en los ecosistemas terrestres, contribuyendo a mantener los ciclos del carbono y de otros elementos. En estos procesos son esenciales los sistemas enzimáticos secretados por las diferentes especies fúngicas, que participan en reacciones de oxidación e hidrólisis. Estas enzimas confieren a los hongos una gran versatilidad para utilizar diferentes fuentes de energía y esto explica que estos organismos sean capaces de desarrollarse en sitios, a priori, inverosímiles.

Este estudio comenzó tras el hallazgo en Belice de un disco compacto (CD) biodeteriorado y el aislamiento de una especie fúngica que se desarrollaba entre las diferentes capas de este CD, destruyendo la información almacenada. En primer lugar, se identificó el hongo aislado como un anamorfo de *Bjerkandera adusta*, en base a su morfología, la secuencia de la región ITS de su ADN_r y su patrón de enzimas extracelulares. Tras comprobar que este hongo degradaba/deterioraba *in vitro* los principales componentes de los CD (policarbonato, metales y colorantes), se estudiaron las enzimas que podrían estar implicadas en estos procesos. Este estudio puso de manifiesto que el anamorfo de *B. adusta* secreta esterasas y diferentes oxidorreductasas descritas en los basidiomicetos implicados en la degradación de la lignina y otros compuestos aromáticos recalcitrantes.

Una de las oxidorreductasas, detectada en los cultivos del anamorfo de *B. adusta*, se ha caracterizado detalladamente, desde un punto de vista bioquímico y molecular. Esta flavoenzima es una oxidasa que comparte propiedades catalíticas con la aril-alcohol oxidasa (AAO), ampliamente estudiada en *Pleurotus eryngii*, y también con la vainillil-alcohol oxidasa de *Penicillium simplicissimum*. Diversos estudios físicoquímicos y cinéticos de la nueva oxidasa, así como su secuencia aminoacídica y su modelo molecular, indican, inequívocamente, que esta enzima es una nueva AAO en la familia glucosa-metanol-colina de oxidorreductasas con una especificidad de sustrato excepcional. Por otra parte, la purificación y caracterización bioquímica de las peroxidasas, que se inducen en el anamorfo de *B. adusta* en presencia de Mn^{2+} , reveló que estas hemoproteínas se incluyen en el grupo de las manganeso peroxidasas (MnP) que requieren Mn^{2+} para completar su ciclo catalítico, similares a las MnP descritas en el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*. Aunque previamente se han caracterizado otras peroxidasas ligninolíticas en diferentes teleomorfos de *B. adusta*, concretamente la lignina peroxidasa y la peroxidasa versátil, cabe destacar que este estudio describe por primera vez la purificación y caracterización de MnP en una cepa del género *Bjerkandera*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CARACTERÍSTICAS Y DEGRADACIÓN DE LA LIGNINA	3
1.1.1. Relevancia ecológica, económica y medioambiental	3
1.1.2. Biosíntesis y estructura química.....	4
1.1.3. Sistema ligninolítico.....	6
1.1.3.1. Lacasas	8
1.1.3.2. Peroxidasas.....	9
1.1.3.3. Enzimas productoras de H ₂ O ₂	13
1.2. FLAVOENZIMAS	15
1.2.1. Descubrimiento, características generales y clasificación.....	15
1.2.2. Propiedades espectroscópicas: estados redox e iónicos y reacción con sulfito	17
1.2.3. Características estructurales de la clase deshidrogenasa/oxidasa	20
1.2.3.1. Interacciones entre el cofactor y la apoproteína	20
1.2.3.2. Localización del sitio de unión al sustrato	21
1.2.3.3. Motivos estructurales conservados	21
1.2.4. Familia GMC de oxidorreductasas	22
1.2.4.1. AAO de <i>P. eryngii</i>	24
1.2.5. Familia vainillil-alcohol oxidasa	26
1.2.5.1. Vainillil-alcohol oxidasa de <i>P. simplicissimum</i>	27
1.2.6. Mecanismo de deshidrogenación	28
1.2.6.1. Reacciones catalizadas por la AAO de <i>P. eryngii</i> y por otras enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas.....	29
1.2.6.2. Reacciones catalizadas por la vainillil-alcohol oxidasa.....	31
1.3. DISCOS ÓPTICOS: CD, DVD y BD	32
1.3.1. Tipos y características generales	32
1.3.2. Composición y estructura.....	33
1.3.2.1. Plásticos.....	34
1.3.2.2. Metales	35
1.3.2.3. Lacas.....	36
1.3.2.4. Colorantes.....	36
1.3.3. Metodología para grabar y reproducir la información.....	37
1.3.3.1. Discos pregrabados.....	37
1.3.3.2. Discos grabables y regrabables.....	39
1.3.4. Degradación de discos ópticos	40
1.4. OBJETIVOS	43
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
2.1. PRODUCTOS COMERCIALES.....	47
2.2. MICROORGANISMOS Y VECTORES.....	51
2.2.1. Cepas fúngicas	51
2.2.2. Cepa bacteriana	51
2.2.3. Vector.....	51
2.3. MEDIOS DE CULTIVO	52
2.3.1. Medios de cultivo fúngicos	52
2.3.2. Medios de cultivo bacterianos.....	54

2.4. MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS	55
2.4.1. Mantenimiento y cultivo de hongos	55
2.4.2. Mantenimiento y cultivo de bacterias.....	56
2.5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	56
2.5.1. Cuantificación de proteínas	57
2.5.2. Cuantificación de sustancias reductoras	57
2.5.3. Determinación de pH.....	58
2.5.4. Cálculo de coeficientes de extinción molar	58
2.5.4.1. Coeficientes de extinción molar de las MnP.....	58
2.5.4.2. Coeficientes de extinción molar de aldehídos.....	58
2.5.4.3. Coeficiente de extinción molar de la AAO.....	59
2.5.5. Valoraciones enzimáticas	59
2.5.5.1. Ensayos directos	59
2.5.5.2. Ensayos acoplados.....	59
2.6. TÉCNICAS MOLECULARES	61
2.6.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	61
2.6.1.1. Aislamiento de ADN genómico de micelio	61
2.6.1.2. Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias	63
2.6.1.3. Aislamiento de ADN de geles de agarosa y de soluciones	63
2.6.1.4. Aislamiento de ARN total de micelio.....	63
2.6.2. Cuantificación y control de calidad de ácidos nucleicos	64
2.6.2.1. Espectroscopia UV	64
2.6.2.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	64
2.6.3. Amplificación de ADN.....	66
2.6.4. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	67
2.6.5. Obtención de fragmentos de restricción con extremos romos a partir de extremos cohesivos	67
2.6.6. Ligación de fragmentos de ADN.....	68
2.6.7. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	68
2.6.8. Selección de bacterias portadoras de plásmidos recombinantes.....	69
2.6.9. Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α	69
2.6.10. Secuenciación de ADN y análisis de secuencias	70
2.7. IDENTIFICACIÓN DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	70
2.7.1. Identificación morfológica	70
2.7.2. Identificación molecular: secuenciación de los espaciadores transcribibles internos (<i>internal transcribed spacer</i> , ITS).....	71
2.8. DEGRADACIÓN DE CD POR EL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	71
2.8.1. Tipos de CD.....	71
2.8.2. Colonización de CD	71
2.8.3. Degradación de diferentes componentes de los CD	72
2.8.3.1. Degradación de colorantes.....	72
2.8.3.2. Degradación de aluminio.....	74
2.8.3.2.1. Cuantificación de aluminio por espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).....	74
2.8.3.2.2. Determinación de ácidos orgánicos por HPLC	74
2.8.3.3. Degradación de policarbonato de BPA.....	75
2.8.3.3.1. Análisis de microscopía óptica y electrónica	75

2.8.3.3.2. Análisis de HPLC	76
2.9. PURIFICACIÓN DE LA AAO Y DE LAS MnP PRODUCIDAS POR EL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	76
2.9.1. Técnicas cromatográficas	76
2.9.2. Concentración y diálisis por ultrafiltración	78
2.10. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA Y ESPECTROSCÓPICA DE LA AAO Y DE LAS MnP DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	79
2.10.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	79
2.10.2. Determinación de la masa molecular	81
2.10.3. Grado de glicosilación	82
2.10.4. Punto isoelectrico	82
2.10.5. Determinación de la secuencia aminoacídica del N-terminal	83
2.10.6. Análisis espectroscópico	83
2.10.6.1. Espectro de absorción de la AAO y de las MnP	84
2.10.6.2. Reducción anaeróbica de la AAO con alcoholes bencílicos	84
2.10.6.3. Reducción anaeróbica de la AAO con ditionito sódico	84
2.10.6.4. Reactividad de la AAO con sulfito sódico	84
2.11. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA AAO DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	84
2.11.1. Oxidación de alcoholes	85
2.11.1.1. Constantes cinéticas de estado estacionario	85
2.11.1.2. Correlaciones cuantitativas entre la estructura de los sustratos y las constantes cinéticas	87
2.11.1.3. Influencia del pH y la temperatura en la actividad y la estabilidad	87
2.11.1.4. Mecanismo cinético: secuencial o <i>ping-pong</i>	88
2.11.2. Oxidación de aldehídos aromáticos	89
2.11.3. Reacciones de desmetilación, hidroxilación y desaminación	90
2.11.4. Estudios de inhibición	90
2.12. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LAS MnP DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	91
2.13. CLONACIÓN DE LA AAO DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	91
2.13.1. Obtención de la secuencia nucleotídica del extremo N-terminal	91
2.13.2. <i>Genome walking</i> mediante <i>single-specific-primer</i> PCR (SSP-PCR)	92
2.13.3. PCR con <i>primers</i> basados en secuencias conservadas	93
2.13.4. <i>Rapid amplification of cDNA ends</i> (RACE)	94
2.13.5. Identificación de intrones	95
2.14. ANÁLISIS <i>in silico</i> DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LA AAO DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	95
2.14.1. Modelado molecular	95
2.14.2. Análisis filogenético	96
3. RESULTADOS	97
3.1. IDENTIFICACIÓN DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	99
3.1.1. Características morfológicas	99
3.1.2. Secuencia de las regiones ITS1, 5,8S e ITS2	100
3.1.3. Oxidorreductasas e hidrolasas extracelulares	101
3.1.3.1. Cultivos en medios sólidos con ABTS	101
3.1.3.2. Cultivos en medio líquido	101
3.2. DEGRADACIÓN DE CD <i>in vitro</i> POR EL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	104

3.2.1. Colonización de CD-A y CD-R.....	104
3.2.2. Deterioro de los componentes de los CD	105
3.2.2.1. Deterioro de colorantes.....	105
3.2.2.2. Deterioro de aluminio.....	107
3.2.2.3. Deterioro de policarbonato de BPA.....	109
3.3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA AAO DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	112
3.3.1. Etapas y rendimiento de la purificación	112
3.3.2. Características fisicoquímicas	114
3.3.2.1. Masa molecular.....	114
3.3.2.2. Punto isoeléctrico.....	114
3.3.2.3. Grado de glicosilación	115
3.3.2.4. Actividad y estabilidad a diferentes valores de pH y de temperatura	115
3.3.2.5. Secuencia aminoacídica del N-terminal.....	116
3.3.3. Características espectroscópicas.....	117
3.3.3.1. Espectro de absorción y coeficiente de extinción molar	117
3.3.3.2. Reducción anaeróbica con alcoholes bencílicos	118
3.3.3.3. Reducción anaeróbica con ditionito sódico	118
3.3.3.4. Reactividad con sulfito sódico	118
3.3.4. Características cinéticas.....	119
3.3.4.1. Oxidación de alcoholes y fenoles	119
3.3.4.1.1. Constantes cinéticas de estado estacionario	119
3.3.4.1.2. Influencia de la estructura de los sustratos en las constantes cinéticas	121
3.3.4.1.3. Efecto del pH en las constantes cinéticas.....	123
3.3.4.1.4. Mecanismo cinético: secuencial o <i>ping-pong</i>	124
3.3.4.2. Oxidación de aldehídos aromáticos	125
3.3.4.3. Reacciones de desmetilación, hidroxilación y desaminación	128
3.3.4.4. Estudios de inhibición.....	128
3.4. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y AMINOACÍDICA DE LA AAO DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	129
3.4.1. Determinación de la secuencia del extremo 5'	129
3.4.2. Determinación de la secuencia del extremo 3'	132
3.4.3. Análisis de la secuencia nucleotídica	132
3.4.3.1. Región codificante.....	133
3.4.3.2. Intrones	133
3.4.3.3. 3'-UTR.....	135
3.4.4. Análisis de la secuencia aminoacídica.....	136
3.4.4.1. Estructura primaria	136
3.4.4.1.1. Composición y sitios de glicosilación.....	136
3.4.4.1.2. Homología con las enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas	138
3.4.4.2. Estructura secundaria.....	141
3.4.4.3. Estructura terciaria.....	143
3.4.4.3.1. Región de unión al FAD	143
3.4.4.3.2. Extensión de la región de unión al FAD	144
3.4.4.3.3. Tapa del FAD.....	144
3.4.4.3.4. Región intermedia y hélice α H5.....	144
3.4.4.3.5. Región de unión al sustrato	145
3.4.4.3.6. Entorno del FAD.....	147

3.4.4.3.7. Interacciones polares entre el FAD y los residuos de su entorno.....	149
3.4.4.4. Análisis filogenético	149
3.5. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MnP DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>.....	152
3.5.1. Etapas de purificación	152
3.5.2. Características fisicoquímicas	152
3.5.2.1. Masa molecular	152
3.5.2.2. Punto isoeléctrico	153
3.5.2.3. Grado de glicosilación	154
3.5.2.4. Secuencia aminoacídica del N-terminal	154
3.5.3. Espectro de absorción y coeficiente de extinción molar	155
3.5.4. Especificidad de sustrato	155
4. DISCUSIÓN	157
4.1. IDENTIFICACIÓN DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	159
4.2. DEGRADACIÓN DE CD POR EL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	160
4.2.1. Colorantes	160
4.2.2. Metales	163
4.2.3. Policarbonato.....	165
4.3. AAO DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	166
4.3.1. Producción, purificación y caracterización fisicoquímica.....	166
4.3.2. Caracterización espectroscópica: efecto de los residuos adyacentes al FAD	169
4.3.3. Actividad catalítica.....	172
4.3.3.1. Oxidación de alcoholes no fenólicos	173
4.3.3.2. Oxidación de alcoholes fenólicos	177
4.3.3.3. Reacciones de desmetilación, hidroxilación y desaminación	179
4.3.3.4. Oxidación de aldehídos aromáticos	180
4.3.4. Una nueva AAO en la familia GMC de oxidorreductasas	183
4.3.4.1. Análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica	183
4.3.4.2. Análisis del modelo molecular	185
4.3.4.2.1. Topología general	186
4.3.4.2.2. Entorno del FAD.....	189
4.3.4.2.3. Canal de acceso de los sustratos al centro activo	192
4.3.5. Mecanismo catalítico.....	195
4.3.5.1. Características generales	195
4.3.5.2. Efecto del pH en la oxidación.....	196
4.3.5.3. Reacción con el O ₂ : mecanismo secuencial o <i>ping-pong</i>	198
4.4. MnP DEL ANAMORFO DE <i>B. adusta</i>	200
4.4.1. Producción, purificación y caracterización fisicoquímica.....	200
4.4.2. Caracterización espectroscópica.....	204
4.4.3. Especificidad de sustrato	205
5. CONCLUSIONES.....	207
6. BIBLIOGRAFÍA.....	211

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CARACTERÍSTICAS Y DEGRADACIÓN DE LA LIGNINA

1.1.1. Relevancia ecológica, económica y medioambiental

Las paredes celulares vegetales están constituidas por diferentes polisacáridos (celulosa, hemicelulosas y peptinas), proteínas, lípidos y minerales e incluyen también lignina en los últimos estadios del desarrollo (Fengel y Wegener, 1984). La lignina es un polímero aromático que se deposita inicialmente en la lámina media y en la pared primaria y finalmente cementa las diferentes capas de la pared secundaria (Fig. 1.1). La pared secundaria presenta el contenido en lignina más elevado, pero la concentración de este polímero es generalmente superior en la lámina media. La lignina, después de la celulosa, es el componente mayoritario de las paredes celulares vegetales y está unida covalentemente a la matriz de polisacáridos (Iiyama *et al.*, 1994).

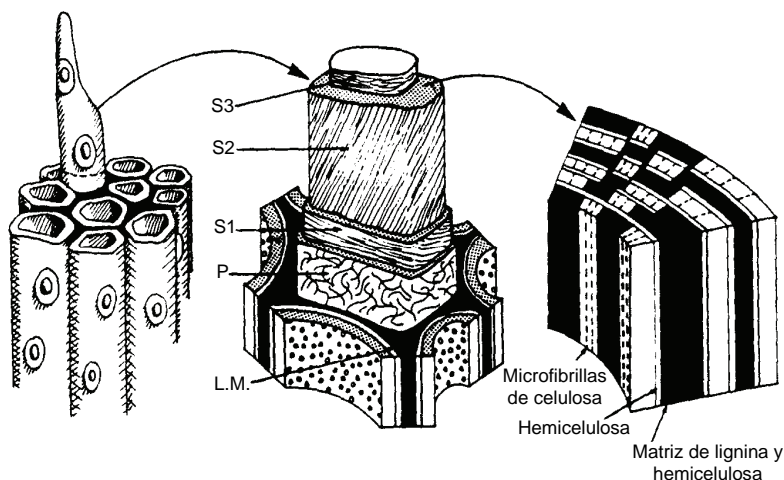


Fig. 1.1. Ilustración esquemática de la estructura y composición de las fibras de madera. L.M., lámina media; P, pared primaria; y S, capa de la pared secundaria. Obtenida de Kirk y Cullen (1998).

La capacidad de sintetizar lignina ha sido esencial en la adaptación evolutiva de las plantas del medio acuático al medio terrestre. Este polímero heterogéneo es fundamental para la integridad estructural de la pared celular y determina la rigidez y resistencia del tallo. La lignina, debido a su naturaleza hidrófoba, impermeabiliza la pared celular, permitiendo el transporte de agua y solutos a través del sistema vascular. Además, es un heteropolímero muy recalcitrante, por lo que protege a las plantas de los patógenos. Sin embargo, su degradación es clave para el reciclado del carbono en los ecosistemas terrestres, puesto que aproximadamente el 20% del carbono fijado mediante la fotosíntesis se

incorpora en la lignina. Además, este proceso de degradación es esencial para la biodisponibilidad de los polisacáridos de la pared celular.

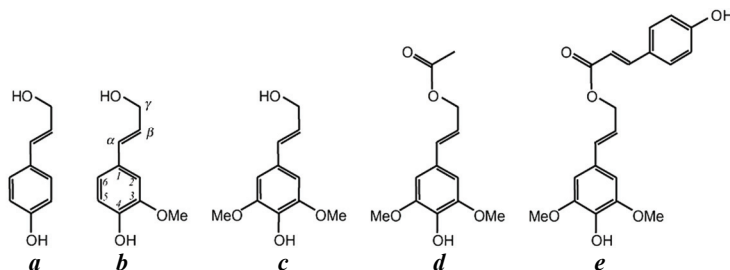
Desde un punto de vista económico y medioambiental, es de gran interés el estudio de la biosíntesis y la biodegradación de la lignina, así como la determinación de su estructura. En base a estos estudios se pueden diseñar diferentes procesos biotecnológicos para el aprovechamiento de la biomasa vegetal, respetuosos con el medio ambiente. En relación con esto, cabe destacar un estudio en el que se redujo la actividad de una de las enzimas implicadas en la biosíntesis de la lignina, mediante técnicas de ingeniería genética (Pilate *et al.*, 2002). Los árboles transgénicos, obtenidos en este estudio, presentaban un contenido inferior en lignina y, por tanto, fueron necesarias cantidades reducidas de reactivos químicos para su deslignificación, y con ellos se fabricó papel de más calidad. En cuanto a la conversión de materiales lignocelulósicos en biocombustibles, otros estudios han revelado que la supresión de algunos genes de la ruta de biosíntesis de lignina, incrementa los rendimientos de azúcares fermentables (Chen y Dixon, 2007). En relación a los estudios de la biodegradación de la lignina y la determinación de su estructura, cabe destacar que han permitido el desarrollo de varias patentes, con diferentes aplicaciones biotecnológicas. Algunas de estas, basadas en diferentes oxidorreductasas ligninolíticas, se describirán en el **Apartado 1.1.3**. Además, estas enzimas, debido a su inespecificidad de sustrato, presentan un elevado potencial en la degradación de compuestos estructuralmente relacionados con la lignina y pueden ser de gran utilidad para biorremediación de ambientes contaminados con diferentes xenobióticos (Barr y Aust, 1994).

1.1.2. Biosíntesis y estructura química

Los precursores de la lignina son los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (**Fig. 1.2A**), compuestos sintetizados a través de la ruta del ácido siquímico (Higuchi, 1990). Las diferentes unidades fenilpropanoides que derivan de estos monolignoles se denominan H (*p*-hidroxifenil), G (guayacil) y S (siringil), según el número de grupos metoxilo de su anillo aromático. En el caso de las angiospermas, es frecuente la presencia de una proporción variable de lignina acilada, que se forma a partir de monolignoles (generalmente sinapílico) γ -esterificados con ácido acético, *p*-cumárico o con otros ácidos orgánicos (**Fig. 1.2A**) (Martínez *et al.*, 2008). La lignina de gimnospermas está constituida fundamentalmente por unidades G (96%), mientras que la lignina de angiospermas leñosas contiene niveles similares de G y de S (50%) y la de angiospermas herbáceas presenta los tres tipos de unidades en diferentes proporciones (70, 25 y 5% de G, S y H, respectivamente) (Wong, 2009). No

obstante, estos valores varían para algunas especies y también según la capa de la pared celular considerada (Higuchi, 1990).

A



B

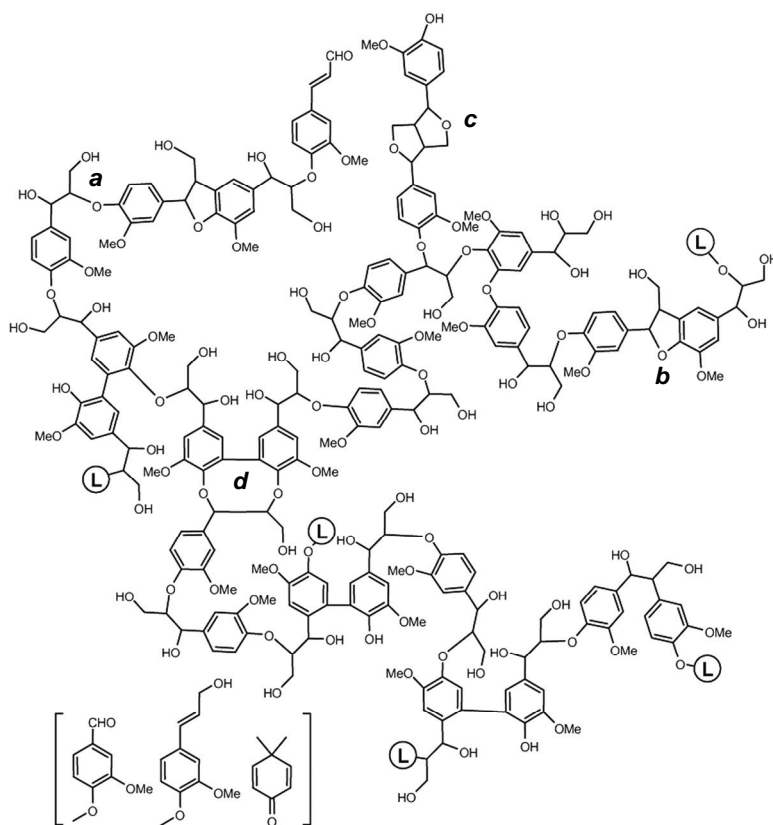


Fig. 1.2. Precusores de lignina (A) y modelo estructural de lignina de gimnospermas (B). A) Alcohol *p*-cumarílico (**a**), coniferílico (**b**), sinapílico (**c**), sinapílico γ -esterificado con ácido acético (**d**) y sinapílico γ -esterificado con *p*-cumárico (**e**). B) Subestructuras β -O-4 (**a**), fenilcumarano (**b**), pinorresinol (**c**) y dibenzodioxocina (**d**) y cadenas adicionales de lignina (**L**). Otras subestructuras menos relevantes incluyen vainillina, alcohol coniferílico y unidades de tipo dimetilciclohexadienona (**corchetes**). Obtenida de Ruiz-Dueñas y Martínez (2009).

La biosíntesis de la lignina consiste en la polimerización deshidrogenativa de los alcoholes *p*-hidroxicinámicos mencionados (Higuchi, 1990; Boerjan *et al.*, 2003). En primer lugar, se produce la oxidación de estos precursores fenólicos a los correspondientes radicales fenoxilo, catalizada por lacasas y peroxidasas vegetales. A continuación, estos radicales forman diferentes dímeros, que pueden ser oxidados enzimáticamente para reaccionar de nuevo. Así, se producen diferentes reacciones de acoplamiento y se configura el polímero de lignina, en el cual predominan los enlaces carbono-carbono y éter. Para la formación de este último tipo de enlace, participa el oxígeno fenólico de los alcoholes cinámicos, por lo que la proporción de subestructuras fenólicas en el polímero de lignina no suele ser elevada (~ 10%) (Camarero *et al.*, 1994). En la **Fig. 1.2B** se muestran varias subestructuras resultantes de los diferentes tipos de enlaces. El enlace de tipo β -O-4 es el más frecuente y el más fácilmente hidrolizado mediante métodos químicos, lo que facilita diferentes procesos industriales (p. ej., pulpeo químico). Otros enlaces presentes en la lignina son el β -5 del fenilcumarano o el β - β del pinorresinol.

1.1.3. Sistema ligninolítico

Como se ha mencionado anteriormente, la degradación de la lignina es un paso clave para el reciclado del carbono en los ecosistemas terrestres y para la utilización de los polisacáridos de las plantas vasculares (p. ej., para fabricación de papel, alimentación animal o producción de biocombustible). Algunos basidiomicetos son los únicos organismos capaces de mineralizar este polímero aromático a CO₂, además de utilizar los polisacáridos de la pared celular como fuente de carbono (Martínez *et al.*, 2005). Estas especies se denominan hongos de podredumbre blanca porque durante la degradación de los materiales lignocelulósicos se suele observar un residuo blanquecino enriquecido en celulosa. Sin embargo, se han descrito otros basidiomicetos, denominados hongos de podredumbre parda, que actúan sobre la lignina, alterando su estructura, para poder metabolizar los polisacáridos y producen un residuo de color marrón. Diversos estudios han demostrado que este grupo de organismos desmetoxila la lignina e incrementa su contenido en hidroxilos fenólicos y, por consiguiente, su reactividad (Niemenmaa *et al.*, 2008; Arantes *et al.*, 2009). Algunos resultados recientes indican que los hongos de podredumbre parda pueden también despolimerizar la lignina pero los radicales resultantes repolimerizan rápidamente y, por tanto, no mineralizan este polímero como los hongos de podredumbre blanca (Yelle *et al.*, 2008).

Los basidiomicetos de podredumbre blanca secretan tres tipos de peroxidasas ligninolíticas denominadas lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14), manganeso

peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) y peroxidasa versátil (VP, EC 1.11.1.7) y también lacasa (EC 1.10.3.2). Estas oxidorreductasas actúan sobre las unidades de la lignina liberando radicales catiónicos muy inestables, que reaccionan espontáneamente (**Fig. 1.3a, b, c, d y e**) (Kirk y Farrell, 1987). Otras enzimas, con un papel relevante en la degradación de la lignina, son diferentes oxidasas extracelulares productoras de H_2O_2 como la aril-alcohol oxidasa (AAO, EC 1.1.3.7) y también las deshidrogenasas intracelulares que reducen compuestos derivados de la degradación de este polímero aromático (**Fig. 1.3f y g**).

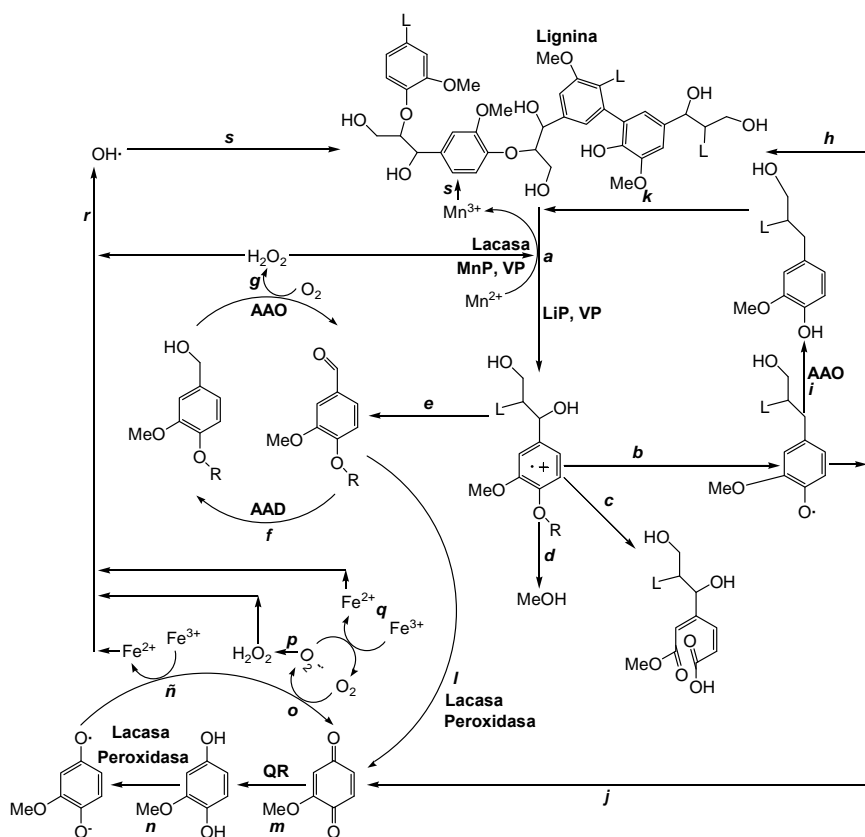


Fig. 1.3. Esquema de las principales reacciones implicadas en la degradación de lignina. AAD, aril-alcohol deshidrogenasa; QR, quinona reductasa; y L, cadenas adicionales de lignina. **a**, oxidación enzimática de lignina; **b**, ruptura del enlace éter del C^4 ; **c**, ruptura del anillo aromático; **d**, desmetoxilación; **e**, ruptura del enlace $C_\alpha-C_\beta$; **f** y **g**, ciclos redox de aldehídos; **h**, **i** y **j**, repolimerización (**h**), reducción (**i**) o conversión en *p*-quinonas (**j**) de radical fenoxilo; **k**, oxidación enzimática de compuestos fenólicos; **l**, oxidación enzimática de aldehídos; **m**, reducción enzimática de *p*-quinona; **n**, oxidación enzimática de hidroquinona; **ñ** y **o**, oxidación de radical semiquinona por Fe^{3+} (**ñ**) o por O_2 (**o**); **p** y **q**, dismutación de O_2^- (**p**) o reducción de Fe^{3+} (**q**); **r**, producción de OH^\cdot mediante la reacción de Fenton; **s**, oxidación de lignina por OH^\cdot o Mn^{3+} . Basado en Martínez *et al.* (2005) y en Gómez-Toribio *et al.* (2009b).

Además de oxidar directamente la lignina o los compuestos resultantes de este proceso, las enzimas ligninolíticas participan en la generación de diferentes oxidantes difusibles de bajo peso molecular: **i)** Mn^{3+} ; **ii)** radicales de productos de despolimerización de lignina o de metabolitos fúngicos (p. ej., veratrílico); y **iii)** especies activas de O_2 (p. ej., $OH\cdot$). Éstos tienen un papel clave en las primeras etapas de la biodegradación de la lignina, puesto que el reducido tamaño de los poros de los materiales lignocelulósicos restringe el acceso a las enzimas (**Fig. 1.3s**) (Flournoy *et al.*, 1993).

En la **Fig. 1.3** se muestra un esquema de las reacciones principales implicadas en la “combustión” de la lignina y en los siguientes apartados se describirán las principales características de las enzimas que oxidan esta recalcitrante red tridimensional. Finalmente, se mencionarán las enzimas implicadas en la producción de H_2O_2 y el papel de este metabolito en la degradación de los materiales lignocelulósicos.

1.1.3.1. Lacasas

Las lacasas son proteínas multicobre que catalizan la oxidación de gran variedad de compuestos fenólicos y aminas aromáticas, con la consiguiente reducción de O_2 a H_2O (Thurston, 1994). Estas fenoloxidasas se descubrieron en el árbol japonés de la laca *Toxicodendron vernicifluum* (Stokes) F. A. Barkley (Yoshida, 1883) y posteriormente se encontraron en hongos (Bertrand, 1896), diferentes plantas, bacterias e insectos (Gianfreda *et al.*, 1999). Las principales funciones fisiológicas de las lacasas fúngicas están relacionadas con la degradación de lignina, el desarrollo y la morfogénesis, la patogénesis y la destoxificación (Thurston, 1994; Zhao y Kwan, 1999; Leonowicz *et al.*, 2001). Estas oxidorreductasas son secretadas por la mayoría de los hongos de podredumbre blanca (Baldrian, 2006). Sin embargo, no se han identificado genes de lacasa en el genoma del basidiomiceto modelo *Phanerochaete chrysosporium* Burds. (Kersten y Cullen, 2007) y tampoco se han detectado estas enzimas en la mayoría de cepas de *Bjerkandera* utilizando diferentes medios y condiciones de cultivo.

A diferencia de las peroxidasas ligninolíticas, las lacasas presentan un potencial redox bajo (0,5-0,8 V) (Alcalde, 2007) por lo que sólo oxidan directamente las unidades fenólicas de la lignina (Kawai *et al.*, 1987). Sin embargo, estas enzimas son capaces de oxidar las unidades no fenólicas y otros compuestos recalcitrantes, en presencia de pequeñas moléculas que forman radicales estables y actúan como mediadores redox (sistema lacasa-mediador) (Brogioni *et al.*, 2008; Morozova *et al.*, 2007). Además, las lacasas participan en ciclos redox de quinonas que implican la formación de especies activas de O_2

(**Fig. 1.3m, n, ñ y o**) (Gómez-Toribio *et al.*, 2009b). Se ha descrito que las lacasas oxidan el sustrato reductor mediante la abstracción de 1 electrón y por tanto se libera un radical catiónico, que puede ser nuevamente oxidado por la enzima (p. ej., fenol a quinona; **Fig. 1.3l**) o participar en reacciones no enzimáticas (p. ej., hidratación o polimerización; **Fig. 1.3h**) (Alcalde, 2007).

Estas oxidorreductasas presentan un gran potencial biotecnológico, debido a su amplia especificidad de sustrato y a que utilizan O₂ como aceptor final de electrones. Así, se han publicado numerosos artículos y patentes relacionadas con la utilización de las lacasas y del sistema lacasa-mediador, en una amplia variedad de industrias (p. ej., papelería, textil, alimentaria, cosmética, nanobiotecnológica, de síntesis química) y también en procesos de biorremediación (Couto y Herrera, 2006; Alcalde, 2007). Sin embargo, el elevado coste y la toxicidad de los mediadores sintéticos, utilizados en concentraciones elevadas, [p. ej., ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) (ABTS)] ha limitado la aplicación industrial de estas enzimas. Recientemente, se ha descrito el papel de diferentes compuestos fenólicos, algunos de ellos derivados de la lignina (p. ej., acetosiringona, siringaldehído), como mediadores naturales de lacasa (Camarero *et al.*, 2005). Éstos no presentan los mismos problemas que los mediadores sintéticos y se ha demostrado su eficacia para degradar compuestos aromáticos tóxicos y para la deslignificación enzimática de la pasta de papel (Cañas *et al.*, 2007; Camarero *et al.*, 2007). Además, el sistema lacasa-mediador también degrada eficazmente compuestos lipofílicos que causan graves problemas económicos y operacionales a la industria papelería (Gutiérrez *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2009).

1.1.3.2. Peroxidasas

Como se ha mencionado anteriormente, los basidiomicetos de podredumbre blanca secretan tres tipos principales de hemo-peroxidasas ligninolíticas de alto potencial redox, denominadas LiP, MnP y VP. Las LiP y MnP se descubrieron en *P. chrysosporium* (Glenn *et al.*, 1983; Tien y Kirk, 1983; Kuwahara *et al.*, 1984) y posteriormente han sido descritas en muchas otras especies fúngicas (Orth *et al.*, 1993; Peláez *et al.*, 1995). Las MnP oxidan preferentemente el Mn²⁺, mientras que las LiP oxidan compuestos aromáticos no fenólicos de alto potencial redox (p. ej., veratrílico). A finales de los años 90, se publicaron los primeros estudios que revelaban la existencia de un tercer tipo de peroxidasa ligninolítica con una especificidad de sustrato más amplia (Martínez *et al.*, 1996; Sarkar *et al.*, 1997; Mester y Field, 1998; Camarero *et al.*, 1999; Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999). Éstas peroxidasas, denominadas VP en 1999 (Camarero *et al.*),

catalizan la oxidación de: **i)** sustratos de la MnP y LiP; **ii)** colorantes y compuestos fenólicos de bajo potencial redox, como las peroxidasas genéricas [p. ej., peroxidasa de *Coprinopsis cinerea* (Schaeff.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo y de *Armoracia rusticana* P. Gaertn., B. Mey. & Scherb. (o rábano picante, HRP)]; y **iii)** compuestos aromáticos y colorantes de alto potencial redox, que la LiP sólo oxida en presencia de mediadores (Heinfling *et al.*, 1998c; Kamitsuji *et al.*, 2005). Las VP se han detectado en los cultivos de diferentes cepas de *Pleurotus* (Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999; Camarero *et al.*, 1999; Sarkar *et al.*, 1997) y *Bjerkandera* (Palma *et al.*, 2000; Heinfling *et al.*, 1998a; Moreira *et al.*, 2005) y más recientemente en *Cerrena unicolor* (Bull.) Murrill (Rainio *et al.*, 2008). Además, se han descrito varias VP hipotéticas en los genomas de otras especies fúngicas (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2009a).

Las peroxidasas ligninolíticas se incluyen en la clase II de la superfamilia de peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas y contienen un grupo hemo tipo b (ferriprotoporfirina IX). Éste se localiza en una cavidad interna que puede estar conectada con el solvente a través de dos canales (Martínez, 2002). Uno de ellos está conservado en todas las hemoperoxidasas y facilita el acceso del H_2O_2 al grupo hemo, mientras que el otro, presente en las MnP y VP, permite la unión del Mn^{2+} al propionato interno del hemo y a tres residuos ácidos adyacentes (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2007). La oxidación de compuestos aromáticos de elevado potencial redox en la LiP y la VP (p. ej., veratrílico), tiene lugar en un Trp que se encuentra en la superficie de la proteína y constituye el inicio de una ruta de transporte electrónico de largo recorrido hasta el hemo. De este modo, la LiP y la VP pueden oxidar sustratos voluminosos, que no pueden acceder al hemo a través de los canales internos de la proteína. Sin embargo, el entorno del Trp de la LiP es más ácido que el de la VP. Esto determina que la LiP requiera mediadores, como el alcohol veratrílico, para oxidar algunos compuestos [p. ej., *Reactive black 5* (RB5)] que la VP oxida directamente a través del Trp catalítico (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2008). En cuanto a los sustratos de bajo potencial redox [p. ej., ABTS, 2,6-dimetoxifenol (DMP)], se ha descrito que la VP de *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél. presenta un sitio de oxidación de baja especificidad en el canal conservado de acceso al hemo y además estos compuestos son oxidados en el Trp catalítico con elevada especificidad (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2008). El tercer sitio de oxidación mencionado para la VP (situado en el canal de acceso al hemo), es similar al de otras peroxidasas como la de *C. cinerea* (Smith y Veitch, 1998; Tsukamoto *et al.*, 1999).

El Mn^{2+} es ubicuo en los materiales lignocelulósicos y en el suelo. Además de ser el sustrato de MnP y VP, este catión reduce el anión O_2^- (liberado en ciclos redox de quinonas) a H_2O_2 (Muñoz *et al.*, 1997). El Mn^{3+} resultante de

(Fe^{3+}), mediante la sustracción de 2 electrones. A la forma oxidada resultante se le denomina Compuesto-I ($\text{Fe}^{4+} = \text{O}$ y radical catiónico de porfirina). A continuación, la peroxidasa recupera el estado de reposo mediante dos reacciones secuenciales de reducción (monoelectrónicas), con la consiguiente oxidación de dos moléculas de sustrato. La forma intermediaria de la enzima que se produce entre ambas reacciones (tras la reducción de la porfirina) se denomina Compuesto-II ($\text{Fe}^{4+} = \text{O}$). En el caso de la VP de *P. eryngii*, se ha descrito que este ciclo incluye dos estados de la enzima adicionales, ambos con un radical triptofanilo neutro (Compuesto-IB y Compuesto-IIB con $\text{Fe}^{4+} = \text{O}$ y Fe^{3+} , respectivamente) (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2009b) (**Fig. 1.4B**). Estos radicales representan un porcentaje reducido de la forma activada de la enzima (Pogni *et al.*, 2006) y están en equilibrio con los Compuestos-I y -II (en la VP denominados -IA y -IIA, respectivamente). En términos generales, el ciclo descrito para la VP también corresponde a la LiP.

Recientemente, se ha descrito un nuevo tipo de peroxidasas en la cepa Dec 1 de *Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk y posteriormente en otros organismos, que se han denominado *dye-decolorizing peroxidase* (DyP) y se han agrupado en una nueva familia (Sugano, 2009). Éstas se caracterizan porque degradan varios colorantes sintéticos y presentan una actividad excepcional sobre los colorantes de tipo antraquinónico. Además, su estructura primaria y terciaria difiere de la de las peroxidasas descritas hasta el momento. Se han purificado y caracterizado dos DyP producidas por *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quérl., un basidiomiceto de podredumbre blanca del grupo de los heterobasidiomicetos u hongos gelatinosos (Liers *et al.*, 2010). Ambas peroxidasas catalizan la conversión de ABTS y DMP y oxidan el colorante de alto potencial redox RB5, pero, a diferencia de las VP, no presentan actividad sobre Mn^{2+} y son muy eficientes utilizando el *Reactive blue 5* como sustrato. Las DyP de *A. auricula-judae* oxidan compuestos no fenólicos (p. ej., veratrílico, dímeros modelo de lignina β -O-4), lo que sugiere que participan en la degradación de la lignina. Sin embargo, en la DyP más ampliamente estudiada, que es producida por *T. cucumeris* Dec 1, no se ha detectado actividad sobre el alcohol veratrílico (Kim y Shoda, 1999).

Las peroxidasas ligninolíticas presentan un elevado potencial como biocatalizadores industriales y en biorremediación, debido a su elevado potencial redox (p. ej., para la deslignificación de materiales lignocelulósicos y la decoloración de efluentes textiles). Entre estas enzimas, destaca la VP por su amplia especificidad de sustrato y porque no requiere mediadores. En relación con esto, cabe destacar que la VP de *Bjerkandera fumosa* (Pers.) P. Karst. presenta elevada actividad en presencia de solventes orgánicos, lo que puede

favorecer su aplicación en determinados procesos industriales (Rodakiewicz-Nowak *et al.*, 2006). Sin embargo, la implementación industrial de estas peroxidasas está limitada principalmente por el bajo rendimiento de los sistemas de expresión heteróloga disponibles y por su inestabilidad frente al H_2O_2 a concentraciones catalíticas (Ayala *et al.*, 2008). No obstante, actualmente se están realizando considerables esfuerzos para solucionar estos problemas mediante diversas técnicas de ingeniería de proteínas (García *et al.*, 2009).

1.1.3.3. Enzimas productoras de H_2O_2

Faison y Kirk (1983) describieron que la producción de H_2O_2 extracelular es clave para la degradación de la lignina en los cultivos de *P. chrysosporium*, tras observar el efecto inhibitorio de la catalasa en este proceso. Posteriormente, numerosos estudios han confirmado que este metabolito es esencial para la biodegradación de los materiales lignocelulósicos en la Naturaleza, tanto para los hongos de podredumbre blanca como de parda. En ambos casos, participa en la formación de $\text{OH}\cdot$ mediante la reacción de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$). Este radical difusible, de bajo peso molecular, actúa eficientemente sobre la celulosa y la lignina. Además, en los hongos de podredumbre blanca, el H_2O_2 es el sustrato oxidante de las peroxidasas ligninolíticas, según se ha detallado en el apartado anterior. Se han descrito varias enzimas fúngicas productoras de H_2O_2 , que podrían estar implicadas en la degradación de la lignina. Éstas se incluyen en la familia glucosa-metanol-colina (GMC) de oxidorreductasas (Cavener, 1992) o son radical-cobre oxidasas (Whittaker, 2003).

En este último grupo destaca la glioxal oxidasa (EC 1.2.3), que se descubrió en el líquido de cultivo de *P. chrysosporium* (Kersten y Kirk, 1987). Esta glicoproteína, monomérica, oxida aldehídos simples y compuestos α -hidroxicarbonílicos y α -dicarbonílicos, que se forman durante la degradación de la lignina. Así, se ha comprobado que la glioxal oxidasa produce H_2O_2 y también oxálico utilizando como sustrato glicolaldehído, derivado de la oxidación de compuestos modelo de lignina β -O-4 (Hammel *et al.*, 1994). Como en el caso de las peroxidasas, la transcripción de la glioxal oxidasa de *P. chrysosporium* se estimula en condiciones limitantes de nutrientes (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009).

En cuanto a las enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas, se ha estudiado el papel de varias de estas flavoenzimas en la degradación de la lignina. La celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18) está ampliamente distribuida entre los diferentes grupos de hongos que colonizan la madera. La transcripción de esta enzima en *P. chrysosporium* se estimula principalmente en presencia de celulosa (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009). Este flavocitocromo

extracelular cataliza la oxidación de celodextrinas a lactonas y puede utilizar gran variedad de aceptores de 1 y 2 electrones, incluyendo el O_2 y el Fe^{3+} . Por tanto, esta enzima participa en la generación de H_2O_2 , O^- y Fe^{2+} (Mason *et al.*, 2003). Además, la celobiosa deshidrogenasa puede facilitar la participación de la MnP (Hildén *et al.*, 2000) y de la metanol oxidasa (EC 1.1.3.13) (Daniel *et al.*, 2007) en la degradación de los materiales lignocelulósicos. Para ello, el OH^- (derivado de la actividad de la celobiosa deshidrogenasa) desmetila la lignina e hidroliza sus enlaces éter y, por consiguiente, incrementa su contenido en unidades fenólicas que son oxidadas directamente por el Mn^{3+} . Paralelamente, el metanol producido en estas reacciones de desmetilación, constituye una fuente de H_2O_2 como sustrato de las metanol oxidasas. Estas flavoenzimas octaméricas, incluidas también en la familia GMC de oxidorreductasas, son producidas por levaduras y basidiomicetos y oxidan el metanol y otros alcoholes alifáticos primarios de cadena corta a sus correspondientes aldehídos. En 1988, a partir del micelio de *P. chrysosporium* se purificó una metanol oxidasa (Eriksson y Nishida) y posteriormente se han detectado elevados niveles de expresión de esta enzima en condiciones ligninolíticas y celulolíticas (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009). Otras dos flavoenzimas productoras de H_2O_2 , incluidas en la misma familia y producidas por *P. chrysosporium*, son la glucosa oxidasa (glucosa 1-oxidasa, EC 1.1.3.4) y la piranosa 2-oxidasa (glucosa 2-oxidasa, EC 1.1.3.10) (Kelley y Reddy, 1986a; Kelley y Reddy, 1986b; Daniel *et al.*, 1994). En esta especie fúngica, se ha descrito que la glucosa oxidasa no se induce en condiciones limitantes de nutrientes (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009), mientras que los genes que codifican la piranosa 2-oxidasa se transcriben paralelamente a los de la LiP y la glioxal oxidasa (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009).

El genoma de *P. chrysosporium* (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009) incluye genes que presentan elevada identidad de secuencia con la AAO secretada por *P. eryngii*, que pertenece también a la familia GMC de oxidorreductasas (Varela *et al.*, 1999). Las AAO participan, junto con aril-alcohol deshidrogenasas (EC 1.1.1.91) intracelulares, en ciclos redox de compuestos aromáticos (metabolitos fúngicos o productos de biodegradación de lignina) que constituyen una fuente continua de H_2O_2 extracelular (**Fig. 1.3f** y **g**) (Guillén *et al.*, 1994; Guillén y Evans, 1994; de Jong *et al.*, 1994a; Hage *et al.*, 1999). Los niveles de producción de la aril-alcohol deshidrogenasa de *P. chrysosporium* se incrementan en condiciones limitantes de nutrientes, pero ninguna de las condiciones testadas estimulan la transcripción de los genes que codifican AAO (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009). En esta especie fúngica, se ha descrito que la presencia de ácido benzoico también induce la producción intracelular de una

aril-alcohol deshidrogenasa y además de una aril-aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.30) (Matsuzaki *et al.*, 2008).

1.2. FLAVOENZIMAS

1.2.1. Descubrimiento, características generales y clasificación

Las flavoenzimas catalizan reacciones redox, utilizando como cofactor flavín mononucleótido (riboflavina-5'-fosfato, FMN) o flavín adenín dinucleótido (FAD) (**Fig. 1.5**). Estudiando la composición de la leche de vaca, Blyth (1879) aisló la vitamina precursora de ambos compuestos. Varios años más tarde, se determinó la estructura de esta vitamina (sintetizada *de novo* por plantas, bacterias y hongos) y se obtuvo mediante síntesis química (Kuhn *et al.*, 1934; Karrer *et al.*, 1935). Se denominó riboflavina, en base a su característico color (en latín *flavus*, amarillo) y a que contiene una molécula de ribitol. Este polialcohol está unido al átomo N¹⁰ de la 7,8-dimetilisoaloxazina (flavina), que es el grupo cromóforo y la parte reactiva del cofactor. La flavina presenta naturaleza anfipática, puesto que está constituida por un dimetilbenceno (hidrófobo) y una pteridina (hidrófila).

El FMN y el FAD se encuentran en aproximadamente un 4% de las proteínas microbianas y eucariotas y, hasta el momento, se han depositado en el *Protein Data Bank* (PDB) más de 1200 estructuras relacionadas con flavoenzimas (Berman *et al.*, 2000). La mayoría de éstas presentan el grupo prostético unido de forma no covalente (~ 90%), pero éste sólo se disocia en condiciones de desnaturalización. No obstante, se han descrito diferentes tipos de enlaces covalentes entre el cofactor y residuos de His, Cys, Tyr, y/o Thr de la apoproteína (8 α -N³-histidil-FAD/FMN, 8 α -N¹-histidil-FAD/FMN, 8 α -O-tirosil-FAD, 8 α -S-cisteinil-FAD, 6-S-cisteinil-FMN, 8 α -N¹-histidil-6-S-cisteinil-FAD/FMN y fosfoester-treonil-FMN) (**Fig. 1.5**). En las flavoenzimas, la unión covalente del cofactor es un proceso autocatalítico y post-traducciona l e incrementa el potencial redox (Heuts *et al.*, 2009). Generalmente, la presencia de una carga positiva en las proximidades de la flavina tiene un efecto similar, mientras que una carga negativa o un ambiente hidrofóbico disminuyen el potencial redox. Así, los cofactores libres en solución presentan un potencial redox de aproximadamente -200 mV, mientras que el de las diferentes flavoenzimas oscila entre -400 y +60 mV (Fraaije y Mattevi, 2000).

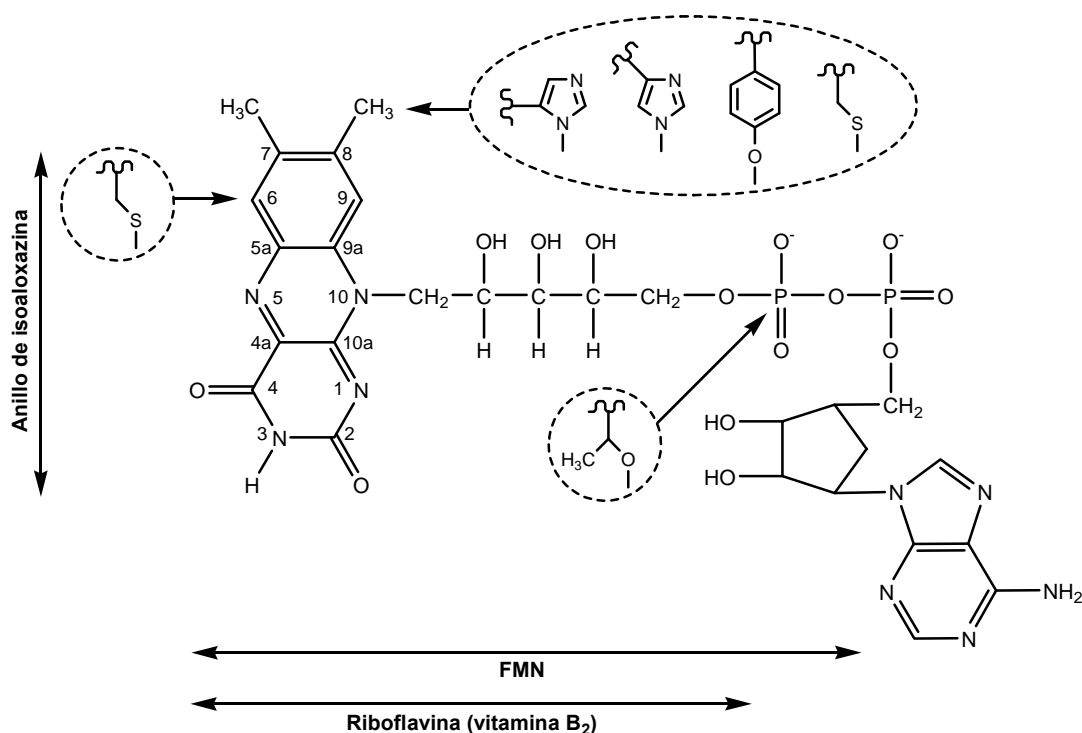


Fig. 1.5. Estructura química del FAD y de los aminoácidos que pueden participar en enlaces covalentes con este cofactor. Las flechas indican los sitios donde se pueden unir los correspondientes aminoácidos (**líneas discontinuas**). Adaptado de Heuts *et al.* (2009).

Las flavoenzimas están implicadas en un amplio rango de procesos biológicos esenciales (p. ej., fotosíntesis, reparación de ADN, fototropismo), debido a la gran versatilidad química del anillo de isoaloxazina (Massey, 2000). La forma oxidada de este compuesto heterocíclico puede ser reducida, eficazmente y de forma reversible, mediante 1 ó 2 electrones. Así, las flavoenzimas son capaces de catalizar la transferencia de electrones, átomos de hidrógeno e iones hidruro. Además, durante estas reacciones se pueden producir diferentes intermediarios covalentes, puesto que el anillo de isoaloxazina es susceptible de ataque nucleofílico (generalmente en los átomos N⁵ y C^{4a}) (Fitzpatrick, 2001).

Las reacciones catalizadas por las flavoenzimas implican dos semi-reacciones secuenciales. En primer lugar, un sustrato o donador de electrones reduce al cofactor (semi-reacción de reducción). A continuación, éste se oxida utilizando otro sustrato o aceptor de electrones (semi-reacción de oxidación). La liberación del producto de la primera semi-reacción del centro activo, se puede producir antes o después de la reoxidación de la enzima (mecanismo cinético

ping-pong o secuencial, respectivamente). Massey y Hemmerich (1980) clasificaron a las flavoenzimas en función de los sustratos implicados en cada semi-reacción. Como se indica en la **Tabla 1.1**, las enzimas incluidas en las cuatro primeras clases catalizan reacciones de deshidrogenación, mientras que las de la última clase participan en la transferencia de un único electrón. Las proteínas de cada clase comparten varias propiedades, como su capacidad o incapacidad para reaccionar con O_2 y para estabilizar radicales aniónicos del cofactor (**Apartado 1.2.2**).

Tabla 1.1. Clasificación de las flavoenzimas¹.

Clase	Reacción	Ejemplo
Transhidrogenasa (deshidrogenasa pura)	Transferencia de $2 e^-$ entre sustratos orgánicos (entre C y N, N y N, C y C, o C y S). Reaccionan lentamente con O_2 y el producto primario es probablemente O_2^- .	Piridina nucleótido transhidrogenasa
Deshidrogenasa /oxidasa	Transferencia de $2 e^-$ entre un sustrato orgánico y el O_2 , formando H_2O_2 .	Glucosa oxidasa
Deshidrogenasa /monooxigenasa	El cofactor, reducido con NAD(P)H, reacciona con O_2 generando un $C(4^a)$ -hidroperóxido ² . Un átomo del O_2 se incorpora en un sustrato orgánico y el otro es reducido a H_2O .	<i>p</i> -Hidroxibenzoato 3-hidroxilasa
Deshidrogenasa /electrón-transferasa	Cofactor utiliza donadores de $2 e^-$ y aceptores de $1 e^-$ o viceversa. Reaccionan lentamente con O_2 y el producto primario es O_2^- .	Ferredoxina-NADP ⁺ reductasa
Electrón-transferasa pura	Transfiere sólo $1 e^-$. Reaccionan lentamente con O_2 y el producto primario es O_2^- .	Flavodoxina

¹Basada en Massey *et al.* (1980).

²Recientemente, este tipo de intermediarios se han descrito también en la piranosa 2-oxidasa y la colina oxidasa (ambas de la clase deshidrogenasa/oxidasa) (Sucharitakul *et al.*, 2008; Orville *et al.*, 2009).

1.2.2. Propiedades espectroscópicas: estados redox e iónicos y reacción con sulfito

En la **Fig. 1.6A** se muestran los estados redox y de ionización de la flavina. En solución, la forma oxidada y totalmente reducida de este compuesto heterocíclico se encuentran en equilibrio y sólo se estabiliza un porcentaje bajo de la forma parcialmente reducida (semiquinona) (Massey, 2000). Esto se debe a que es más negativo el potencial para la reducción del estado oxidado a la semiquinona (E_{ox}/E_{sq}) que para la reducción de la semiquinona a la hidroquinona (E_{sq}/E_{hq}) (Draper y Ingraham, 1968). Las propiedades espectroscópicas de los diferentes estados redox han sido ampliamente estudiadas y permiten determinar los mecanismos de reacción y cinéticos de las diferentes flavoenzimas. El FMN y el FAD oxidados (libres en solución) exhiben un máximo de absorción próximo a 450 nm y tienen un característico color amarillo. En este estado redox, el anillo

de isoaloxazina presenta valores de pK_a próximos a 0 y a 10 para los átomos N^1 y N^3 , respectivamente. Tras su reducción monoelectrónica, se forma un radical de color azul ($\lambda_{\max} \sim 560$ nm) o rojo ($\lambda_{\max} \sim 390$ -410 y 480 nm), en función de su estado de protonación (semiquinona neutra o aniónica, respectivamente). Este estado redox del cofactor presenta un pK_a básico de 8,3 para el átomo N^5 . Si el anillo de isoaloxazina está totalmente reducido (mediante $2 e^-$), no presenta color o es amarillo pálido y se ioniza con un pK_a básico de 6,7. Sin embargo, este equilibrio se modifica, drásticamente, tras la unión del cofactor a la apoproteína. Algunas flavoenzimas no estabilizan semiquinonas, mientras que otras estabilizan prácticamente el 100%. Generalmente, en estas últimas se forma sólo la semiquinona neutra o la aniónica, a todos los valores de pH en los que la enzima es estable (según incremente o disminuya el pK_a básico del cofactor al unirse a la apoproteína). No obstante, con algunas enzimas, es posible visualizar ambos radicales variando el pH. Este es el caso de la glucosa oxidasa, que presenta un pK_a de 7,3 (Massey y Palmer, 1966; Stankovich *et al.*, 1978) (**Fig. 1.6B**).

Como se mencionó en el apartado anterior, las flavoenzimas se pueden agrupar en diferentes clases en base a los sustratos implicados en la reacción y a otras propiedades. Así, cabe destacar que las transhidrogenasas no estabilizan ningún tipo de radical del cofactor, mientras que las enzimas que reaccionan eficazmente con O_2 (deshidrogenasas/-oxidadas y -oxigenasas) estabilizan la semiquinona aniónica. En el caso de las deshidrogenasas/electrón-transferasas y de las electrón-transferasas puras, se ha detectado el radical neutro con estabilidad moderada o elevada, respectivamente. Los estudios realizados con estas flavoenzimas indican que la semiquinona neutra presenta relevancia catalítica, mientras que el radical aniónico no participa en la catálisis (Hemmerich y Massey, 1977).

Los estudios de Massey *et al.* (1969) indicaron que sólo las flavoenzimas que utilizan preferentemente el O_2 como aceptor final de electrones, son capaces de formar un aducto reversible entre el anión sulfito (SO_3^{2-} o HSO_3^-) y el átomo N^5 de la flavina, además de estabilizar la semiquinona aniónica del cofactor. Diferentes estudios de mutagénesis dirigida indican que ambas reacciones están facilitadas por la presencia de una carga positiva próxima al anillo de isoaloxazina (Leferink *et al.*, 2009; Ghanem y Gadda, 2006). Ésta podría ejercer atracción electrostática o favorecer la reacción al aumentar el potencial redox de la enzima. Así, Yorita *et al.* (2000) observaron una correlación lineal directa entre el potencial redox y la velocidad de reacción con sulfito (para potenciales redox inferiores a -120 mV), utilizando la apoproteína L-lactato oxidasa reconstituida con diferentes análogos de flavina. En todos los casos, la reacción

con el sulfito depende de la concentración de este anión, de la temperatura y del pH, pero no está afectada por el O_2 o por la luz (Müller y Massey, 1969). Los espectros de absorción UV-Vis de las flavoenzimas complejadas con sulfito son similares a los de la proteína completamente reducida (**Fig. 1.6B**).

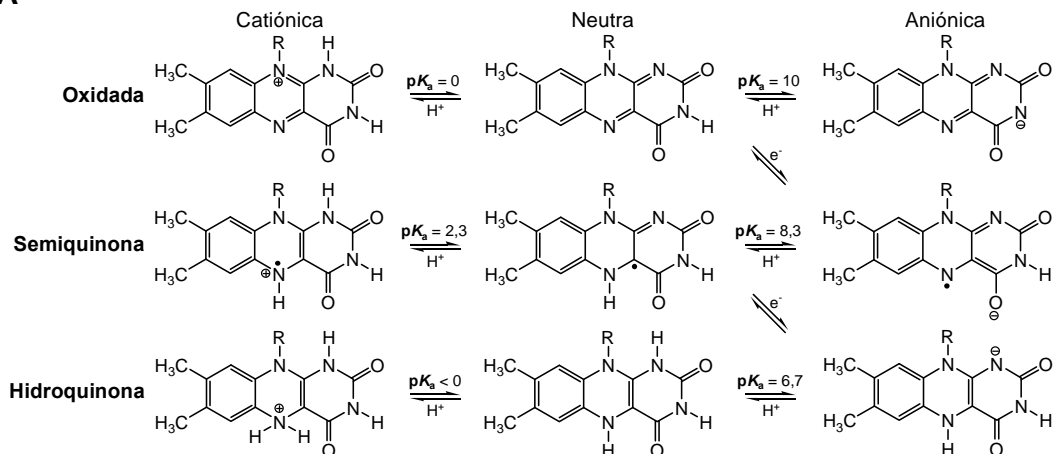
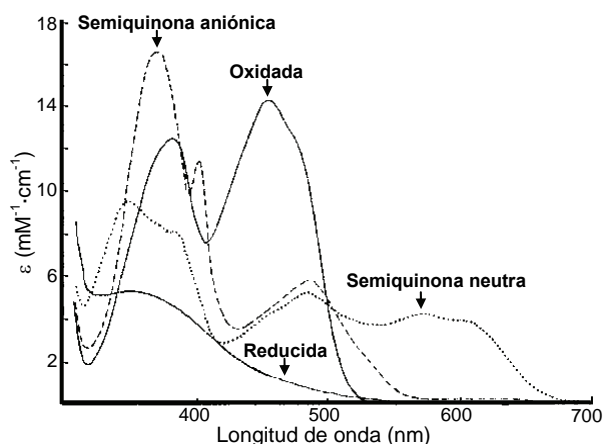
A**B**

Fig. 1.6. Estados redox e iónicos de la flavina. A) Estructuras de la flavina en solución. Adaptado de Miura (2001). B) Espectros de absorción de la glucosa oxidasa según su estado de oxidorreducción. Adaptado de Massey (2000).

1.2.3. Características estructurales de la clase deshidrogenasa/oxidasa

1.2.3.1. Interacciones entre el cofactor y la apoproteína

Senda *et al.* (2009) han descrito que el ángulo de inclinación del anillo de isoaloxazina de las flavoproteínas varía entre 0 y 34°, aunque éste es inferior a 10° en la mayoría de los casos y en algunas flavoenzimas varía dependiendo del estado redox. Independientemente del ángulo de inclinación, en todos los casos, el cofactor establece interacciones con la apoproteína que modulan la actividad de la enzima.

El anillo de isoaloxazina del FMN interacciona preferentemente con átomos de las cadenas laterales de los residuos adyacentes, mientras que el del FAD establece contacto generalmente con los átomos de las cadenas principales. Estos últimos son menos flexibles, lo que sugiere que la unión del FAD a la apoproteína es más rígida que la del FMN. Sin embargo, en el FAD son ligeramente más frecuentes las interacciones de los átomos N¹ y N⁵ con cadenas laterales, que las de los átomos N³, O² y O⁴. Esto se ha relacionado con que el estado de protonación de los dos primeros átomos varía durante la catálisis (**Fig. 1.6A**) (Senda *et al.*, 2009).

La mayoría de las oxidasas dependientes de flavina presentan una carga positiva en las proximidades de los átomos N¹-C² = O (< 3,5 Å), debida a un residuo cargado positivamente o al N-terminal de una hélice α . Esta carga estabiliza la forma aniónica de la flavina reducida y ligandos cargados negativamente (p. ej., sulfito), incrementa el potencial redox y facilita la unión del cofactor a la apoproteína en las enzimas que no presentan el cofactor disociable (Ghanem y Gadda, 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, la forma oxidada de la flavina no presenta el átomo N⁵ protonado, a diferencia de la forma hidroquinona y semiquinona neutra (**Fig. 1.6A**). Esto favorece su interacción con residuos donadores o aceptores de puentes de hidrógeno, respectivamente. Muchas oxidasas dependientes de flavina presentan un residuo donador de puentes de hidrógeno en las proximidades del átomo N⁵ (Fraaije y Mattevi, 2000), como la T169 de la piranosa 2-oxidasa. Esta Thr participa en la semi-reacción de reducción y de oxidación, según diversos estudios de mutagénesis dirigida, estructurales y cinéticos (Pitsawong *et al.*, 2010). Concretamente, la T169 interacciona con el complejo enzima-sustrato y estabiliza el intermediario C(4^a)-hidroperoxiflavina. Sin embargo, se han descrito oxidasas dependientes de flavina con un residuo aceptor de puentes de hidrógeno en las proximidades del átomo N⁵, como la vainillil-alcohol oxidasa (EC 1.1.3.38) (Mattevi *et al.*, 1997).

1.2.3.2. Localización del sitio de unión al sustrato

Según un estudio reciente realizado con todas las enzimas dependientes de FAD depositadas en el PDB, el 95% presenta un área muy reducida de la flavina expuesta al solvente ($< 10\%$) (Senda *et al.*, 2009). Entre estas flavoenzimas se incluyen las de la clase deshidrogenasa/oxidasa, que presentan una cavidad que aísla al anillo de isoaloxazina (Fraaije y Mattevi, 2000). Esta estrategia protege a los intermediarios de reacción lábiles, limita el volumen de los sustratos (y por tanto influye en la especificidad de la enzima), facilita las interacciones electrostáticas y polares y es adecuada para sustratos poco solubles e hidrofóbicos (Mattevi *et al.*, 1997). Se han descrito diferentes mecanismos que modulan el acceso de los sustratos al centro activo, como canales hidrofóbicos (Chen *et al.*, 2008) o bucles (*loops*) que experimentan cambios conformacionales (Kujawa *et al.*, 2006).

Actualmente, se dispone de la estructura cristalográfica de varias flavoenzimas de la clase deshidrogenasa/oxidasa, complejadas con sustratos, inhibidores o productos. La naturaleza química y el volumen de estos compuestos varían considerablemente según la enzima. Sin embargo, el átomo que corresponde al sitio de ataque oxidativo (CH) se localiza generalmente en las proximidades del átomo N⁵ de la flavina ($\sim 3,5$ Å), definiendo un ángulo con el N⁵ y el N¹⁰ de 96-117° (Fraaije y Mattevi, 2000). En la **Fig. 1.7A**, se muestra que la localización de este átomo coincide en dos flavoenzimas diferentes (como en la mayoría), mientras que en la colesterol oxidasa (EC 1.1.3.6) de tipo I y la hidroxinitrilo liasa (EC 4.1.2.10) se observa una disposición excepcional. En la colesterol oxidasa, el ángulo N¹⁰-N⁵-CH es superior (162°), pero esto se debe a las condiciones experimentales utilizadas (Lario *et al.*, 2003). En el caso de la hidroxinitrilo liasa, el cofactor no está implicado en la reacción catalizada por esta enzima (Dreveny *et al.*, 2009).

1.2.3.3. Motivos estructurales conservados

En las proteínas que utilizan como cofactores nucleótidos, se han descrito motivos estructurales conservados que participan en la unión de estas moléculas a la apoproteína. En las deshidrogenasas dependientes de el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD), se descubrieron dos motivos compuestos por hebras β paralelas, intercaladas entre hélices α ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$ y $\beta_4\alpha_4\beta_5\alpha_5\beta_6$) (Rossmann *et al.*, 1974). Éstos se denominaron motivos clásicos de unión a mononucleótidos o plegamientos de Rossmann y están conectados entre sí por una hélice α (α_3 entre β_3 y β_4). Posteriormente, diferentes variaciones de estos motivos estructurales se han descrito en proteínas que contienen otros nucleótidos, como FMN, FAD o dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato

(NADP) (Rao y Rossmann, 1973; Dym y Eisenberg, 2001; Schulz y Schirmer, 1974). Además de este motivo estructural, se han descrito otros motivos conservados característicos de los miembros de las diferentes familias dependientes de FAD (Dym y Eisenberg, 2001).

Las flavoenzimas de la familia GMC de oxidorreductasas (**Apartado 1.2.4**) presentan sólo uno de los dos plegamientos de Rossmann completo ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$). En este motivo, las hebras β se sitúan junto a dos hebras β adicionales (β_7 y β_8) constituyendo una lámina β paralela. Además, las hebras β_3 y β_7 están conectadas por una lámina β antiparalela (β_4 , β_5 y β_6). El dominio de unión al FAD de las proteínas de la familia vainillil-alcohol oxidasa (**Apartado 1.2.5**) también está constituido por dos láminas β y varias hélices α , pero su disposición no concuerda con la que se observa en los plegamientos de Rossmann (Dym y Eisenberg, 2001). En ambas familias, el cofactor se dispone de forma elongada, con la adenina situada en el dominio de unión al FAD y el anillo de isoaloxazina en el extremo opuesto. Las secuencias consenso que estabilizan al cofactor en estas familias son diferentes. Sin embargo, la secuencia más conservada de cada familia interacciona mediante puentes de hidrógeno con el grupo pirofosfato del cofactor, mientras que la adenina y la flavina interaccionan con secuencias parcialmente conservadas entre los miembros de cada familia (Dym y Eisenberg, 2001). A diferencia de las proteínas de la familia GMC de oxidorreductasas (Hol *et al.*, 1978; Wierenga *et al.*, 1985), los miembros de la familia de la vainillil-alcohol oxidasa no presentan el extremo N-terminal de una hélice α próximo al grupo pirofosfato del cofactor para compensar su carga.

1.2.4. Familia GMC de oxidorreductasas

Cavener (1992) definió la familia GMC de oxidorreductasas, en base a un análisis comparativo de las secuencias primarias de las flavoenzimas glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.10), metanol oxidasa, glucosa oxidasa y colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1). Este estudio puso de manifiesto que las proteínas mencionadas presentan una secuencia similar (23-32% de identidad de secuencia) y un motivo $\beta\alpha\beta$ de unión a ADP en su extremo N-terminal (característico de proteínas dependientes de FAD y NAD) (Wierenga *et al.*, 1986). Desde entonces, se han incluido en esta familia un gran número de flavoenzimas de organismos procariotas y eucariotas (p. ej., colesterol oxidasa tipo I, colina oxidasa, hidroxinitrilo liasa) y se han identificado tres nuevos motivos conservados en sus secuencias primarias (Kiess *et al.*, 1998). Además, diversos estudios estructurales han revelado que todas las proteínas de esta familia presentan una topología general común (Mattevi, 1998; Kiess *et al.*, 1998).

En la **Fig. 1.7B** se muestra la estructura cristalográfica de una de las proteínas de la familia GMC de oxidorreductasas, la AAO del basidiomiceto *P. eryngii*. Esta enzima se pliega definiendo un dominio de unión al sustrato y otro de unión al FAD, como los demás miembros de esta familia. La AAO es una flavoenzima monomérica, como la colesterol oxidasa tipo I y la hidroxinitrilo liasa. Sin embargo, otras proteínas de esta familia son oligoméricas, como la glucosa oxidasa y la colina oxidasa (EC 1.1.3.17) (homodímeros) o la piranosa 2-oxidasa (homotetrámero). Además, esta familia incluye la hemoflavoenzima celobiosa dehidrogenasa, que consta de un módulo que contiene FAD como cofactor (con los motivos conservados de la familia GMC de oxidorreductasas), unido a un citocromo con un hemo tipo *b* (mediante un péptido rico en Ser y Thr) (Zámocký *et al.*, 2004). En algunas de estas dehidrogenasas, se ha descrito un módulo adicional de unión a carbohidratos, mientras que otras celobiosa dehidrogenasas contienen una región con esta función en el módulo unido a FAD. Independientemente del estado de oligomerización, todas estas flavoenzimas contienen una molécula de FAD de conformación elongada, unida a la apoproteína de forma covalente o no covalente.

Todas las proteínas de esta familia son oxidorreductasas, a excepción de la hidroxinitrilo liasa (Dreveny *et al.*, 2001). Sin embargo, difiere considerablemente la naturaleza química y el volumen de sus sustratos (p. ej., monosacáridos, colesterol, alcoholes alifáticos). Esto concuerda con su baja identidad de secuencia en el dominio de unión al sustrato, en comparación con el dominio de unión al FAD. Sin embargo, el análisis de sus estructuras cristalográficas ha revelado que tienen residuos conservados próximos a la flavina, lo que sugiere que podrían presentar un mecanismo catalítico común. Entre estos, destaca un residuo de His totalmente conservado y otro de His/Asn, que delimitan el sitio de unión al sustrato (**Fig. 1.7A**). En la AAO de *P. eryngii*, estos residuos corresponden a la H502 y a la H546, respectivamente. Los estudios de mutagénesis dirigida, realizados con esta AAO y con las demás enzimas de esta familia, indican inequívocamente que ambos residuos conservados participan en la unión de los sustratos y/o en la catálisis (Ferreira *et al.*, 2006; Witt *et al.*, 2000; Ghanem y Gadda, 2005; Rungsruriyachai y Gadda, 2008; Dreveny *et al.*, 2009; Rotsaert *et al.*, 2003b; Yue *et al.*, 1999; Lyubimov *et al.*, 2009) (**Apartado 1.2.6.1**). En las proximidades de estos residuos, la AAO de *P. eryngii* presenta dos aminoácidos aromáticos (Y92 y F501) necesarios para su actividad, según los estudios de mutagénesis de Ferreira *et al.* (2006). La mayoría de las enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas presentan un residuo aromático en la posición de la F501 y algunas de ellas incluyen otro en una posición similar a la de la Y92.

1.2.4.1. AAO de *P. eryngii*

Las oxidorreductasas secretadas por *P. eryngii* han sido extensivamente estudiadas, debido a la gran eficacia de este basidiomiceto para degradar la lignina de las paredes celulares vegetales (Stajic *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2005). Entre estas enzimas se incluye la AAO, que cataliza la deshidrogenación de una amplia variedad de alcoholes primarios insaturados a sus correspondientes aldehídos, reduciendo el O₂ a H₂O₂. Según los estudios de especificidad de sustrato y cinéticos, realizados por Guillén *et al.* (1992) y Ferreira *et al.* (2005), el *p*-anisílico es el mejor sustrato de esta flavoenzima, pero además oxida eficientemente una amplia variedad de alcoholes bencílicos, cinamílicos, naftílicos y alifáticos poliinsaturados y presenta baja actividad sobre aldehídos aromáticos.

En la década de los 90, se publicaron los primeros estudios de la AAO secretada por *P. eryngii* (Guillén *et al.*, 1990; Guillén *et al.*, 1992). Posteriormente, se clonó el gen que codifica esta oxidasa (Varela *et al.*, 1999) y se diseñó un sistema de expresión eficaz en *Escherichia coli* (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006). La AAO purificada de los cultivos de *P. eryngii* es una flavoenzima monomérica de 69,1 kDa y un 10% de carbohidratos unidos mediante enlace *N*-glicosídico (valores determinados con MALDI-TOF). Esta oxidasa presenta un punto isoeléctrico (pI) de 3,9 y su actividad sobre alcohol veratrílico es óptima a pH 5,0 y 55 °C. Incluye una molécula de FAD unida de forma no covalente y máximos de absorción a 384 y 460 nm (Guillén *et al.*, 1992). Las propiedades fisicoquímicas y catalíticas de la enzima fúngica y de la recombinante son similares (Varela *et al.*, 1999; Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006), por lo que se ha utilizado la enzima recombinante para llevar a cabo los estudios cinéticos, estructurales y de efecto isotópico que se mencionarán posteriormente.

Han sido descritas otras AAO en diferentes especies de *Pleurotus* (Bourbonnais y Paice, 1988; Sannia *et al.*, 1991; Varela *et al.*, 2000a; Okamoto y Yanase, 2002) y en los basidiomicetos *Trametes versicolor* (L.) Fr., *Bjerkandera* spp., *P. chrysosporium* y *T. cucumeris* Dec 1 (Farmer *et al.*, 1960; Muheim *et al.*, 1990; Asada *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001). A excepción de la AAO de *P. chrysosporium*, estas oxidasas son extracelulares y presentan una especificidad de sustrato y unas propiedades fisicoquímicas similares a las de la AAO de *P. eryngii*. También se ha descrito actividad AAO en los ascomicetos *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Botrytis cinerea* Pers. y *Aspergillus terreus* Thom (Iwahara *et al.*, 1980; Goetghebeur *et al.*, 1992; Kumar y Goswami, 2008) y en insectos y gasterópodos fitófagos (Large y Connock, 1993; Bruckmann *et al.*, 2002; Michalski *et al.*, 2008). Sin embargo, la mayoría de los estudios relacionados con las AAO, se han centrado en la oxidasa de *P. eryngii* y, por tanto, ésta se suele

utilizar como modelo o referencia. Hasta el momento sólo se ha determinado la secuencia nucleotídica de la AAO de *P. eryngii* y de *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. y presentan un 95% de identidad de secuencia (Varela *et al.*, 1999; Varela *et al.*, 2000a). Sin embargo, también se han identificado varias AAO hipotéticas en los genomas de diferentes especies fúngicas [p. ej., *P. chrysosporium*, *Postia placenta* (Fr.) M. J. Larsen & Lombard, *Laccaria bicolor* (Maire) P. D. Orton] (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2008). Como se ha mencionado anteriormente, Fernández *et al.* (2009) han publicado la estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii* a 2,4 Å de resolución y ésta es la primera y única estructura tridimensional de una AAO disponible (PDB: 3FIM; **Fig. 1.7B**).

En la secuencia de la AAO de *P. eryngii* se han identificado los motivos conservados en la familia GMC de oxidoreductasas. Esta proteína consta de 593 aminoácidos, que incluyen un péptido señal de 27 residuos (GenBank: AAC72747.1) (Varela *et al.*, 2000b). La secuencia madura de esta AAO (y la de *P. pulmonarius*) presenta la identidad más elevada con la piranosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.29), la colina deshidrogenasa y la alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) (38, 34 y 33%, respectivamente), además de con otras proteínas hipotéticas. Comparando la secuencia de la AAO de *P. eryngii* únicamente con proteínas de estructura cristalográfica conocida, el mejor resultado se obtuvo con la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* Tiegh., la colina oxidasa de *Arthrobacter globiformis* Conn, la glucosa oxidasa de *Penicillium amagasakiense* Kusai y la hidroxinitrilo liasa de *Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb (29, 29, 28 y 26% de identidad de secuencia, respectivamente).

En el dominio de unión al FAD de la AAO de *P. eryngii*, destaca una lámina β (paralela), situada entre un grupo de tres hélices α y dos láminas β contiguas (antiparalelas). El dominio de unión al sustrato incluye una larga lámina β central (antiparalela), rodeada por varias hélices α . Ambos dominios están conectados por una región que restringe el acceso al centro activo (**Fig. 1.7B**, rojo) y también por dos regiones diferentes que incluyen una lámina β (paralela) (Fernández *et al.*, 2009). Aunque las enzimas de la familia GMC de oxidoreductasas presentan una topología general común, se han descrito en ambos dominios algunos elementos estructurales que varían entre ellas (Fernández *et al.*, 2009). Estos serán analizados en detalle posteriormente (**Apartado 4.3.4.2**).

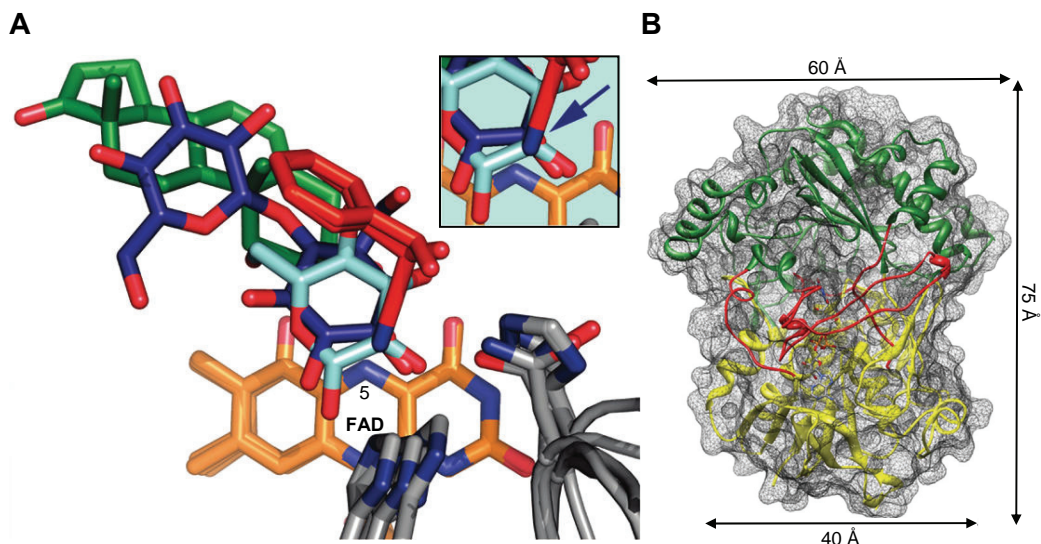


Fig. 1.7. Detalle de las estructuras cristalográficas superpuestas de varias flavoenzimas de la familia GMC de oxidorreductasas, unidas a un sustrato, un inhibidor o un producto (A) y estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii* (PDB: 3FIM) (B). A) Verde, sustrato de la colesterol oxidasa de tipo I (PDB: 1COY); azul oscuro, inhibidor de la celobiosa deshidrogenasa (PDB: 1NAA); azul claro, producto de reacción de la piranosa 2-oxidasa (PDB: 2F5V); rojo, sustrato y producto de reacción de la hidroxinitrilo liasa (PDB: 3GDN); naranja, FAD; y gris, dos residuos conservados en la familia GMC de oxidorreductasas (His e His/Asn). Obtenido de Dreveny *et al.* (2009). B) Representación de la estructura secundaria de la AAO y de su superficie molecular. Verde, dominio de unión al sustrato; amarillo, dominio de unión al FAD; y rojo, elementos estructurales que conectan ambos dominios. Obtenido de Fernández *et al.* (2009).

1.2.5. Familia vainillil-alcohol oxidasa

La familia vainillil-alcohol oxidasa engloba a diferentes flavoenzimas, procariotas y eucariotas, que presentan un dominio de unión al FAD conservado. El miembro más representativo de esta familia es la vainillil-alcohol oxidasa de *Penicillium simplicissimum* (Oudem.) Thom, puesto que el análisis de su secuencia y de su estructura cristalográfica condujo al descubrimiento de esta familia (Fraaije *et al.*, 1998). Otros miembros destacados son la *p*-cresol metilhidroxilasa (EC 1.17.99.1), la D-lactato deshidrogenasa (EC 1.1.2.4), la L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (EC 1.3.2.3), la colesterol oxidasa tipo II y la alditol oxidasa (EC 1.1.3.41).

Estas flavoenzimas catalizan diferentes reacciones redox en una amplia variedad de rutas metabólicas, como la síntesis de antibióticos y alcaloides, el metabolismo de carbohidratos o la destoxificación de fenoles (Leferink *et al.*, 2008a). El cofactor de estas enzimas presenta conformación elongada y

generalmente se une a la apoproteína de forma covalente (mediante todos los tipos de enlaces descritos, **Apartado 1.2.1**). Además, la mayoría de estas enzimas utilizan O_2 como aceptor final de electrones, con la consiguiente formación de H_2O_2 . Entre las excepciones, figura la L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa, que presenta el FAD disociable y reacciona ineficazmente con O_2 (Leferink *et al.*, 2008b).

Las proteínas de la familia vainillil-alcohol oxidasa no presentan homología estructural ni de secuencia, con los miembros de la familia GMC de oxidorreductasas. Sin embargo, se han descrito proteínas de las dos familias que catalizan la misma reacción. Este es el caso de la colesterol oxidasa de tipo I y de tipo II que presentan la misma actividad y están incluidas en la familia GMC de oxidorreductasas y en la familia de la vainillil-alcohol oxidasa, respectivamente. Otro ejemplo lo constituyen las dos oxidasas de alcoholes aromáticos anteriormente mencionadas, la AAO y la vainillil-alcohol oxidasa. Sin embargo, la vainillil-alcohol oxidasa sólo actúa sobre compuestos *para*-hidroxilados, a diferencia de la AAO que oxida preferentemente los alcoholes no fenólicos. Previamente, otros autores han constatado que las flavoenzimas presentan una relación reducida entre su topología y su función, puesto que el poder catalítico de estas proteínas reside en el centro activo (Fraaije y Mattevi, 2000).

1.2.5.1. Vainillil-alcohol oxidasa de *P. simplicissimum*

En 1990, se aisló el hongo *P. simplicissimum* de los efluentes de una fábrica de papel y se comprobó que este ascomiceto es capaz de utilizar diferentes compuestos aromáticos como única fuente de carbono y energía (p. ej., veratrílico, vainillílico, *p*-anisílico) (de Jong *et al.*, 1990). Del micelio de esta especie fúngica se purificó una proteína que oxida el alcohol vainillílico a vainillina, reduciendo el O_2 a H_2O_2 (de Jong *et al.*, 1992b). Esta enzima presenta con el *p*-hidroxibencílico una actividad más reducida, pero no oxida el veratrílico (u otros alcoholes aromáticos sin un grupo OH en posición *para*) ni los alcoholes alifáticos o los aldehídos aromáticos. Teniendo en cuenta estos primeros estudios de especificidad de sustrato, la proteína purificada se denominó vainillil-alcohol oxidasa.

Posteriormente, se descubrió que esta flavoenzima también cataliza reacciones de desaminación, desmetilación e hidroxilación de una gran variedad de compuestos aromáticos *para*-hidroxilados (Fraaije *et al.*, 1995). La producción de esta oxidasa se induce en presencia de uno de los sustratos, *p*-(metoximetil)fenol, pero también con veratrílico y *p*-anisílico. Sin embargo, *P. simplicissimum* no produce vainillil-alcohol oxidasa utilizando vainillílico o glucosa como única fuente de carbono. En vista de estos resultados y de que la

vainillil-alcohol oxidasa no cataliza ninguna de las reacciones implicadas en la degradación de veratrílico o *p*-anisílico, Fraaije *et al.* (1997) concluyeron que la función fisiológica de esta oxidasa es la desmetilación de *p*-(metoximetil)fenol. Este y otros sustratos similares, podrían estar disponibles en la Naturaleza, como resultado de la biodegradación de la lignina por otras especies fúngicas (**Apartado 1.1**). Posteriormente, en la cepa V107 del ascomiceto *Byssochlamys fulva* Olliver & G. Sm. se encontró una oxidasa similar a la vainillil-alcohol oxidasa de *P. simplicissimum* (Furukawa *et al.*, 1999) pero, hasta el momento, no se ha estudiado en detalle.

La vainillil-alcohol oxidasa es un homooctámero de 520 kDa, que presenta en cada subunidad una molécula de FAD unida covalentemente (enlace 8α - N^3 -histidil-FAD) (de Jong *et al.*, 1992b). Todas las subunidades contienen 560 aminoácidos e incluyen dos dominios (Mattevi *et al.*, 1997). El dominio de unión al FAD consiste en dos láminas β (antiparalela y mixta), rodeadas por seis hélices α . El dominio de unión al sustrato incluye una larga lámina β (antiparalela) flanqueada por siete regiones de hélices α . El centro activo de la vainillil-alcohol oxidasa está localizado en la cara *si* del anillo de isoaloxazina y está delimitado principalmente por residuos aromáticos e hidrofóbicos. Éstos definen una cavidad elongada (~ 200 Å), que es totalmente inaccesible al solvente. Hasta el momento, no se ha identificado ningún elemento estructural, cuyo cambio conformacional permita el acceso del sustrato al centro activo. La disposición de la flavina es planar y en su entorno se localizan dos residuos cargados, la R504 y el D170. La R504 establece un puente de hidrógeno con el átomo O^2 y estabiliza la semiquinona aniónica del cofactor (van den Heuvel *et al.*, 2000). Ésta se observa durante la reducción anaeróbica de la enzima con ditionito mediante ensayos espectrofotométricos, pero no se produce si se utiliza vainillílico como agente reductor (de Jong *et al.*, 1992b). El D170 está situado a tan sólo 3,5 Å del N^5 de la flavina. Como se mencionó anteriormente, esto diferencia a la vainillil-alcohol oxidasa de la mayoría de las oxidasas dependientes de FAD, que presentan un residuo donador de puentes de hidrógeno en las proximidades del átomo N^5 de la flavina (en vez de un aceptor). Además, mediante mutagénesis dirigida, se ha comprobado que el residuo ácido D170 evita la reacción de la enzima con sulfito (van den Heuvel *et al.*, 2000).

1.2.6. Mecanismo de deshidrogenación

Las reacciones de deshidrogenación consisten en la ruptura de al menos un enlace CH, con la consiguiente transferencia de dos electrones a un aceptor. Las flavoenzimas catalizan la deshidrogenación de una gran variedad de compuestos, como aminas, α -hidroxiácidos, α -aminoácidos, alcoholes, ditioles, etc. En estas

proteínas se han propuesto tres mecanismos para la transferencia de los dos electrones desde el C- α del sustrato hasta el N⁵ de la flavina (Ghisla y Massey, 1989; Fraaije y Mattevi, 2000): **i)** mecanismo carboaniónico que implica la abstracción de un protón del C- α (mediante una base del centro activo) para formar un carboanión, que transfiere los dos electrones a la flavina directamente o mediante un intermediario covalente; **ii)** transferencia de un átomo de hidrógeno (1 e^- , 1 H^+) con la consiguiente formación de un radical del sustrato y otro de la flavina, que reaccionan y se produce la transferencia del segundo electrón; y **iii)** transferencia directa de un anión hidruro (2 e^- , 1 H^+).

Varias flavoenzimas de la familia GMC de oxidorreductasas y de la familia de la vainillil-alcohol oxidasa, catalizan la oxidación deshidrogenativa de alcoholes a aldehídos o cetonas, utilizando O₂ como aceptor final de electrones (p. ej., AAO, metanol oxidasa, colina oxidasa, glucosa oxidasa, colesterol oxidasa, vainillil-alcohol oxidasa). Diversos estudios indican que estas reacciones se producen mediante el último mecanismo de deshidrogenación mencionado, según se describe en los siguientes apartados (Fitzpatrick, 2001).

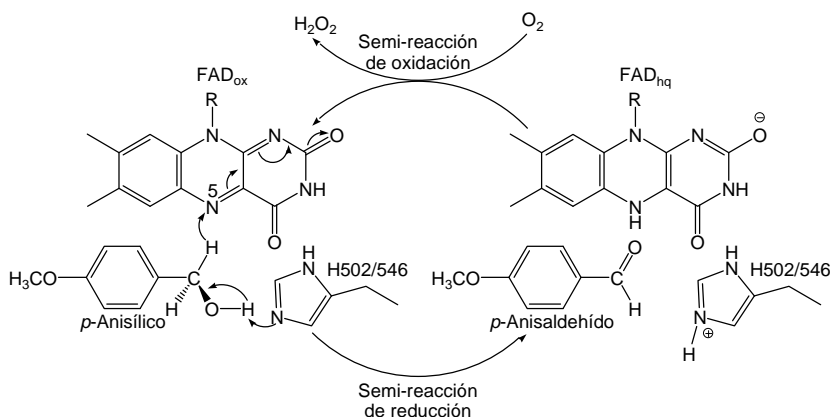
1.2.6.1. Reacciones catalizadas por la AAO de *P. eryngii* y por otras enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas

Recientemente, Ferreira *et al.* (2009) determinaron el mecanismo catalítico de la AAO de *P. eryngii* mediante estudios cinéticos y de efecto isotópico (**Fig. 1.8A**). Los resultados obtenidos indican que la semi-reacción de reducción consiste en la transferencia directa de un anión hidruro desde el C- α del sustrato activado, hasta el N⁵ de la flavina. Esta semi-reacción es esencialmente irreversible y es el paso limitante de la reacción. Este mecanismo de deshidrogenación tiene lugar para la oxidación de alcoholes (Ferreira *et al.*, 2009) y también de aldehídos hidratados (Ferreira *et al.*, 2010).

Los estudios de *docking* con esta AAO, indican que el sustrato se sitúa equidistante entre la H502 y la H546 (conservadas en la familia GMC de oxidorreductasas), formando el complejo de Michaelis-Menten (Ferreira *et al.*, 2006). Esta disposición ($a < 4\text{ Å}$ del N⁵ de la flavina) facilita la activación del sustrato mediante la abstracción de un protón del hidroxilo del C- α y la consiguiente reducción del cofactor. Según los estudios de efecto isotópico, la ruptura de ambos enlaces (OH y CH) se produce sincrónicamente, sin la estabilización de un intermediario de tipo alcóxido (Ferreira *et al.*, 2009). Estos resultados concuerdan con el hecho de que esta AAO no estabiliza la semiquinona aniónica del cofactor ni el ión sulfito, a diferencia de la mayoría de oxidasas dependientes de flavina (Ferreira *et al.*, 2005). El estudio del efecto del pH en la V_{max} de la AAO de *P. eryngii*, reveló que un residuo protonado, con un

pK_a próximo a 8,5, participa en la reacción, probablemente en la estabilización del sustrato (Ferreira *et al.*, 2009). Este valor de pK_a podría corresponder a una de las dos His mencionadas, mientras que la otra podría actuar como base catalítica en la activación del sustrato.

A



B

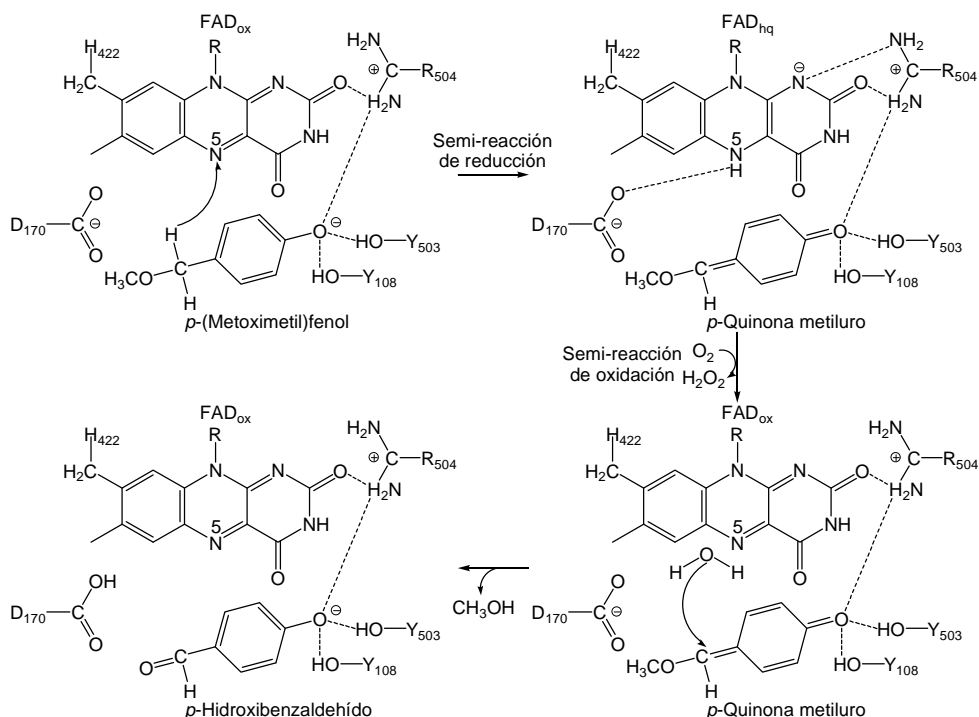


Fig. 1.8. Representaciones esquemáticas del mecanismo catalítico de la AAO de *P. eryngii* (A) y de la vainillil-alcohol oxidasa de *P. simplicissimum* (B). Adaptadas de Ferreira *et al.* (2009) y de van den Heuvel *et al.* (2000), respectivamente.

En las demás enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas, el sustrato adopta generalmente la misma disposición y la deshidrogenación tiene lugar a través de un mecanismo catalítico similar (Fitzpatrick, 2007). Según estudios de mutagénesis, estructurales y/o cinéticos en la glucosa oxidasa, la metanol oxidasa, la celobiosa deshidrogenasa y la piranosa 2-oxidasa, la His totalmente conservada es probablemente la base catalítica que activa al sustrato (H502 de la AAO de *P. eryngii*) (Wohlfahrt *et al.*, 2004; Menon *et al.*, 1995; Rotsaert *et al.*, 2003a; Kujawa *et al.*, 2006). Sin embargo, la His homóloga en la estructura cristalográfica de la colesterol oxidasa, está protonada a valores de pH óptimos para su actividad (H447), lo que indica que no desempeña la misma función (Lyubimov *et al.*, 2006). En el caso de la colina oxidasa, ninguna de las dos His del centro activo (H351 e H466) son esenciales para la activación del sustrato, según los estudios de la influencia del pH en los valores de las constantes cinéticas de los correspondientes mutantes (Ghanem y Gadda, 2005; Rungsisuriyachai y Gadda, 2008).

La colina oxidasa cataliza la oxidación de colina a glicina betaína, mediante la formación del intermediario betaína-aldehído (Gadda, 2008). Esto implica dos reacciones secuenciales y la transferencia de cuatro electrones. En ambas reacciones, el cofactor reduce O_2 a H_2O_2 . El intermediario permanece unido al centro activo de la enzima y se hidrata antes de la segunda reacción de oxidación. En esta enzima, una base del centro activo no identificada (con un pK_a de 7,5) es la responsable de la activación del sustrato (colina o betaína-aldehído hidratado), formando un alcóxido. Éste es estabilizado electrostáticamente por la H466 protonada (H502 en la AAO de *P. eryngii*) y posteriormente se produce la reducción del cofactor. Como en esta proteína, en la metanol oxidasa se ha demostrado que la ruptura del enlace OH precede a la del enlace CH (Menon *et al.*, 1995) y en la glucosa oxidasa y la colesterol oxidasa podría tener lugar el mismo mecanismo (Bright y Gibson, 1967; Kass y Sampson, 1998a; Kass y Sampson, 1998b). Hasta el momento, la AAO de *P. eryngii* es la única enzima de esta familia en la que se ha demostrado inequívocamente que no se estabiliza un intermediario alcóxido durante la catálisis (Ferreira *et al.*, 2009).

1.2.6.2. Reacciones catalizadas por la vainillil-alcohol oxidasa

Como se mencionó en el **Apartado 1.2.5.1**, la vainillil-alcohol oxidasa cataliza diferentes reacciones y presenta una amplia variedad de sustratos aromáticos *para*-hidroxilados. Independientemente del tipo de reacción, todos los sustratos de esta enzima son oxidados más eficazmente a pH básicos, que facilitan la desprotonación del hidroxilo fenólico. Otra característica común, para todas las

reacciones, es que se inician con la oxidación del C- α mediante la transferencia directa de un hidruro al átomo N⁵ de la flavina, con la consiguiente formación de un intermediario de tipo *p*-quinona metiluro. Además, en todos los casos, el FAD reducido es oxidado por O₂ para formar H₂O₂ (**Fig. 1.8B**). Sin embargo, se han descrito algunas características que no se producen en todas las reacciones. Por ejemplo, la desmetilación del *p*-(metoximetil)fenol implica la hidratación de la correspondiente *p*-quinona metiluro, con la consiguiente formación de un hemiacetal inestable que se descompone rápidamente para liberar metanol y *p*-hidroxibenzaldehído (**Fig. 1.8B**). Sin embargo, en el caso del alcohol vainillílico, se produce la desprotonación directa de la correspondiente *p*-quinona metiluro, sin la adición de H₂O (Fraaije y van Berkel, 1997). Además, la vainillil-alcohol oxidasa presenta un mecanismo catalítico ternario con el *p*-(metoximetil)fenol, mientras que esta enzima oxida el vainillílico probablemente mediante un mecanismo de tipo *ping-pong* (Fraaije y van Berkel, 1997).

Mattevi *et al.* (1997) determinaron la estructura cristalográfica de la vainillil-alcohol oxidasa complejada con diferentes inhibidores. Estos adoptan una disposición compatible con un mecanismo catalítico que implica la transferencia directa del hidruro desde el sustrato a la flavina (C- α a $\sim 3,5$ Å del N⁵). En el centro activo de la vainillil-alcohol oxidasa se localizan los residuos Y108, Y503 y R504, que activan al sustrato mediante la estabilización de su forma fenolato (**Fig. 1.8B**). Como se mencionó anteriormente, en las proximidades de la flavina se encuentra también un residuo aceptor de puentes de hidrógeno (D170 a $\sim 3,5$ Å del N⁵). Los resultados obtenidos mediante una combinación de estudios cristalográficos, espectroscópicos y cinéticos, indican que este residuo ácido interacciona probablemente con el N⁵ protonado de la flavina incrementando su potencial redox, además de favorecer la formación del enlace covalente entre la apoproteína y el cofactor (van den Heuvel *et al.*, 2000).

1.3. DISCOS ÓPTICOS: CD, DVD y BD

1.3.1. Tipos y características generales

En 1982, las empresas *Philips* y *Sony* comercializaron los primeros discos compactos con música (*audio compact disc*, CD-A). Tan sólo tres años después, se distribuyeron los CD con otros tipos de datos digitales para ordenadores (*CD-read only memory*, CD-ROM). Posteriormente, se han diseñado una amplia variedad de discos ópticos (**Fig. 1.9**) (Mustroph *et al.*, 2006), entre los que destacan los CD grabables (*CD-recordable*, CD-R) y los discos versátiles digitales (*digital versatile disc*, inicialmente *digital video disc*, DVD) pregrabados y grabables (DVD 5 y DVD-/+R, respectivamente). También cabe

mencionar los discos regrabables (CD-RW, DVD-/+RW), aunque se comercializan en menor medida que los anteriores. Las nuevas generaciones de discos, denominadas DVD de alta definición (*high definition*-DVD, HD-DVD) y discos *Blu-Ray* (*Blu-Ray disc*, BD), compiten actualmente en el mercado por sustituir a los otros formatos mencionados.

Todos los tipos de discos ópticos presentan un espesor aproximado de 1,2 mm y generalmente un diámetro de 120 mm (incluyendo un orificio central de 15 mm). Además, la composición, la estructura y la metodología de fabricación de los diferentes formatos son similares. Su componente mayoritario es policarbonato y también incluyen metales y lacas y para algunos tipos de discos se utilizan además colorantes. Como se describirá en el siguiente apartado, estos materiales se distribuyen en diferentes capas superpuestas. En cuanto a sus prestaciones tecnológicas, los discos se diferencian principalmente en el volumen de información que almacenan. Así, la capacidad máxima de los CD es de 700 MB, mientras que los DVD, los HD-DVD y los BD almacenan 4,7, 15 y 25 GB, respectivamente (si tienen sólo una superficie de lectura).

PREGRABADOS	GRABABLES	REGRABABLES	NUEVA GENERACIÓN
CD	CD-R	CD-RW	HD-DVD
CD-A			
CD-ROM			
DVD	DVD-/+R	DVD-/+RW	BD
DVD 5	DVD-R	DVD-RAM	
DVD 10	DVD+R	DVD+RW	
DVD 9	DVD+R <i>dual layer</i>	DVD-RW	
DVD 14			
DVD 18			
Formatos especiales			
SACD			
DVD <i>plus</i>			
<i>Flexplay</i>			
DVD <i>audio</i>			

Fig. 1.9. Principales tipos de discos ópticos. Adaptado de Mustroph *et al* (2006).

1.3.2. Composición y estructura

Los CD pregrabados están constituidos por una lámina de plástico (1,2 x 120 x 120 mm), sobre la que se deposita una capa metálica (50 nm), otra de laca y finalmente una etiqueta identificativa opcional (**Fig. 1.10A**). Los CD grabables presentan la misma estructura, pero incluyen una película de un colorante orgánico entre el plástico y el metal (**Fig. 1.10B**). Los DVD y los BD se caracterizan porque contienen una capa de plástico adicional, sobre la que se coloca la etiqueta. En los siguientes apartados, se describen las principales características y las funciones de los materiales mencionados. Además, se explicará brevemente como se graba y se reproduce la información de los discos y, finalmente, se comentarán algunos estudios relacionados con su degradación.

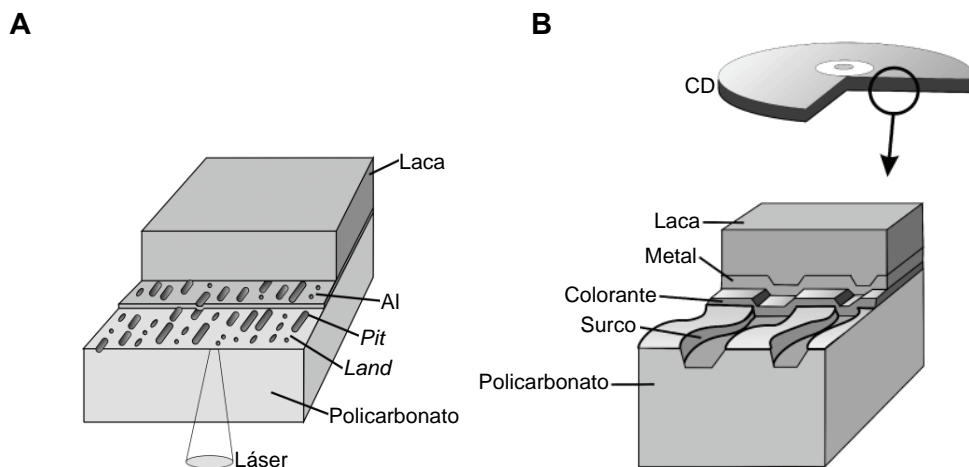


Fig. 1.10. Estructura de CD-A (A) y CD-R (B). Adaptado de Mustroph *et al.* (2006).

1.3.2.1. Plásticos

Los primeros CD fueron fabricados con el policarbonato de la empresa *Bayer*, sintetizado con bisfenol A [2,2-bis-(4-hidroxifenil)propano, BPA] y denominado *Makrolon*[®] (**Fig. 1.11A**) (<http://plastics.bayer.com>). Actualmente, este polímero sintético continúa siendo el más demandado para la producción de los diferentes tipos de discos ópticos, aunque su estructura química ha evolucionado paralelamente a las características y a los procesos de fabricación de los discos. Las últimas formulaciones (*Makrolon*[®] CD 2005 y DP 1-1265) acaparan aproximadamente una tercera parte de la producción mundial de policarbonato para discos ópticos, aunque otras empresas distribuyen polímeros similares [p. ej., *Lexan*[®] (*GE*), *Calibre*[™] (*Dow*), *Panlite*[®] (*Teijin*), *Iupilon*[®] (*Mitsubishi*)]. Además de para la fabricación de discos, se han desarrollado policarbonatos específicos para la producción de una amplia variedad de artículos (p. ej., gafas, lentes de contacto, faros de automóviles, botellas, tejados).

La síntesis de policarbonato se inicia con la reacción de la sal sódica de BPA con fósgeno (disuelto en una solución alcalina acuosa y un solvente orgánico inerte, respectivamente). A continuación, los oligómeros resultantes polimerizan en presencia de aminas terciarias. Otra posibilidad para la producción de este plástico, consiste en la transesterificación de un bisfenol con un carbonato (p. ej., carbonato de difenilo), catalizada por una base (Artham y Doble, 2008). El policarbonato obtenido por ambos procesos se puede utilizar para la fabricación de discos ópticos. Generalmente, esto se lleva a cabo mediante moldeo por inyección. En este proceso, el policarbonato granulado se funde en una extrusora y, a continuación, se inyecta en un molde y se enfría. De esta forma, se obtiene

una fina lámina de policarbonato con la información impresa en una de las superficies (**Apartado 1.3.3.1**).

Las características básicas de los plásticos apropiados para la fabricación de discos ópticos son (Kaempff, 1987): **i)** elevada transmisión de luz (a la λ del láser utilizado para grabar y reproducir los discos); **ii)** elevada estabilidad dimensional (frente a cambios de temperatura y humedad); **iii)** baja birrefringencia; **iv)** rigidez mecánica; **v)** máxima pureza; **vi)** índice de fluidez elevado y constante; y **vii)** moderada o baja absorción de H_2O . Estas propiedades se han analizado en varios termoplásticos, en comparación con el policarbonato [p. ej., poli(metilmetacrilato), policloruro de vinilo y poliestireno] (Kaempff, 1987; Bates *et al.*, 2001). La mayor desventaja del policarbonato es que puede desarrollar birrefringencia. Sin embargo, las variantes de este polímero, específicas para discos ópticos, incluyen modificaciones estructurales que permiten mantener los niveles de birrefringencia dentro de los límites permitidos (Birkett, 2002; Kaempff, 1987). Entre los plásticos que compiten con el policarbonato, el poli(metilmetacrilato) destaca por su resistencia, transparencia y baja birrefringencia. Sin embargo, este polímero presenta una absorción de agua considerablemente superior a la del policarbonato (2,1 y 0,4% en condiciones saturantes de humedad, respectivamente) (Mills, 2005). Otra alternativa considerada, más recientemente, es el poliestireno hidrogenado, denominado policiclohexiletileno (Bates *et al.*, 2001).

1.3.2.2. Metales

Todos los tipos de discos ópticos contienen una capa de un metal reflector sobre la capa donde se almacena la información. Ésta se deposita generalmente mediante pulverización catódica (*sputtering*). Los CD pregrabados y los DVD 5/10 incluyen Al. En los CD/DVD-R, el láser tiene que atravesar una capa de colorante para reproducir los datos, por lo que estos discos requieren un metal más reflector que el Al. Generalmente, en éstos se utiliza Au o Ag, que, además de ser buenos reflectores, no suelen reaccionar con los colorantes a diferencia del Al (Birkett, 2002).

Los DVD 9 presentan dos superficies de lectura en el interior del disco, separadas por una capa de laca (50 μm) (Cord *et al.*, 2006). A diferencia de los DVD 10, los DVD 9 se reproducen en su totalidad sin que el usuario tenga que darlos la vuelta. Esto es posible porque contienen una capa de Au semitransparente con una reflectividad del 20%, que puede ser atravesada por el láser para acceder a la segunda superficie de lectura (localizada en la parte superior del disco). Sobre esta última, se deposita un metal más reflector. Se han diseñado otros discos con una estructura similar, que incluyen 3 y 4 superficies

de lectura (DVD 14 y DVD 18, respectivamente). Estos últimos presentan una capacidad de almacenamiento muy elevada, pero no están muy extendidos porque son caros y difíciles de producir (Mustroph *et al.*, 2006).

En 1996, se desarrollaron los formatos regrabables que se utilizan actualmente. Estos discos incluyen varias capas en las que se encuentran aleaciones de diferentes metales (Ag, Zn y Cr) (Mustroph *et al.*, 2006).

1.3.2.3. Lacas

La capa metálica reflectora de los CD está protegida por una capa de laca acrílica, que es curada mediante luz UV. También se utilizan lacas similares para unir la segunda capa de policarbonato de los DVD. Estas lacas contienen generalmente acrilatos de uretano o de epoxi (diluidos con un monómero acrílico) y un fotoiniciador (Birkett, 2002). Generalmente, se dispensan mediante impregnación centrífuga (*spin-coating*). En el caso de los DVD, se puede aplicar la laca en la parte central del disco y, a continuación, ésta se distribuye mediante fuerzas centrífugas. En los DVD 9, el láser atraviesa la capa de laca para acceder a la segunda superficie de lectura. Por tanto, ésta debe ser muy transparente y presentar un índice de refracción muy similar al del policarbonato.

1.3.2.4. Colorantes

En 1989, la compañía japonesa *Taiyo Yuden* distribuyó los primeros CD-R. Estos presentaban la misma estructura básica que los diferentes tipos de discos grabables comercializados actualmente (Mustroph *et al.*, 2006). En estos formatos, la información se almacena en un colorante orgánico termosensible, que se deposita sobre el policarbonato (**Apartado 1.3.3.2**). Generalmente, el colorante se prepara en un solvente muy volátil y se aplica mediante *spin-coating*. Otra posibilidad, es que se distribuya sobre el plástico mediante sublimación. Algunas de las propiedades óptimas de los colorantes utilizados en los discos ópticos son (Mustroph *et al.*, 2006): **i)** elevada capacidad para absorber radiación (a la λ del láser utilizado para grabar los discos); **ii)** baja conductividad térmica; **iii)** estabilidad a la luz, al calor y a la humedad; **iv)** baja toxicidad; **v)** capacidad para distribuirse uniformemente sobre el plástico; y **vi)** solubilidad en solventes orgánicos. Se han desarrollado un extenso número de patentes de colorantes para discos ópticos. Entre estas, destacan las que están relacionadas con colorantes de tipo cianina y ftalocianina y con complejos de colorantes azo y metales (Mustroph *et al.*, 2006).

Los colorantes de tipo cianina fueron los primeros que se utilizaron para los CD-R. Estos presentan elevada absorción y reflexión y baja conductividad térmica. Para la fabricación de discos ópticos, se utilizan generalmente las

cianinas que derivan de la indolenina. Estas tienden a agregarse menos y presentan más solubilidad en solventes orgánicos y estabilidad térmica que otras cianinas (p. ej., benzo-oxazol, benzo-tiazol, quinoleína) (Mustroph *et al.*, 2006). El inconveniente de este tipo de colorante es que presenta una estabilidad a la luz relativamente baja. En presencia de luz y de O₂ son destruidas por el oxígeno singlete (¹O₂) que se forma fotoquímicamente (Byers *et al.*, 1976). No obstante, se han descrito aditivos para estos colorantes que incrementan su estabilidad. Las ftalocianinas son extraordinariamente estables a la luz e insensitivas a diversos factores químicos (Mustroph *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría no son muy solubles en solventes orgánicos y además son más caras que las cianinas. Varios estudios se han centrado en los colorantes azo unidos a metales (Wang *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005). Estos complejos presentan mayor estabilidad a la luz y al calor que las cianinas, permiten modificar más fácilmente su longitud de onda de absorción (variando los sustituyentes) y presentan mejor solubilidad que las ftalocianinas en muchos solventes orgánicos. Además, se han descrito recientemente nuevos colorantes azo complejados con metales que absorben a valores de longitudes de onda relativamente bajos (350-400 nm) y, por tanto, presentan un elevado potencial para los discos de nueva generación (Nejati *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

1.3.3. Metodología para grabar y reproducir la información

1.3.3.1. Discos pregrabados

En los discos pregrabados, la información se imprime en una de las superficies del policarbonato utilizando un molde (estampa). Como resultado, se obtiene una espiral de marcas sucesivas (“puntos” y “rayas”) excavadas en el plástico. Éstas se denominan *pits*, mientras que las áreas entre las marcas son los *lands* (**Fig. 1.10A**). Para reproducir el disco, el láser atraviesa el policarbonato (desde la superficie no grabada) hasta la capa metálica depositada sobre los *pits* y los *lands*. A continuación, la luz reflejada por el metal se dirige a un fotodetector.

Los *pits* y los *lands* reflejan la luz con distinta intensidad. De esta forma, se codifica la información mediante un sistema binario. Las regiones entre los *pits* y los *lands* corresponden a 1, mientras que las zonas donde no se registran cambios en la intensidad de reflexión se traducen como 0 (**Fig. 1.11A**). En los CD comunes, la longitud de los *pits* varía entre 0,9 y 3,3 μm, mientras que la anchura y la profundidad son constantes (~ 0,8 y 0,5 μm, respectivamente). Los *pits* y los *lands* son inferiores en los DVD y los BD, para incrementar la capacidad de almacenamiento (**Fig. 1.12**). Esto implica una reducción de la longitud de onda

del láser utilizado para reproducir la información (780, 650, 405 nm para CD, DVD y BD, respectivamente).

En la **Fig. 1.11B**, se muestra un esquema del proceso de fabricación de la estampa utilizada para grabar los discos ópticos (Emmelius *et al.*, 1989). En primer lugar, se deposita sobre un disco de cristal una sustancia fotorresistente positiva. A continuación, varios puntos de esta sustancia se exponen a un láser y se eliminan mediante una solución (estos puntos corresponderán a los *pits* de los discos). Sobre la superficie remanente se aplica una película de níquel (50-100 nm), que se engrosa por electrodeposición y se separa del cristal. Finalmente, se obtienen varias copias complementarias del molde metálico, mediante electrodeposición, pero éstas no se utilizan para imprimir el plástico. A partir de ellas se fabrican nuevas copias complementarias, que son las estampas definitivas. Durante la fabricación de los discos ópticos, el policarbonato fundido es inyectado a alta presión sobre la correspondiente estampa y a continuación se enfría rápidamente.

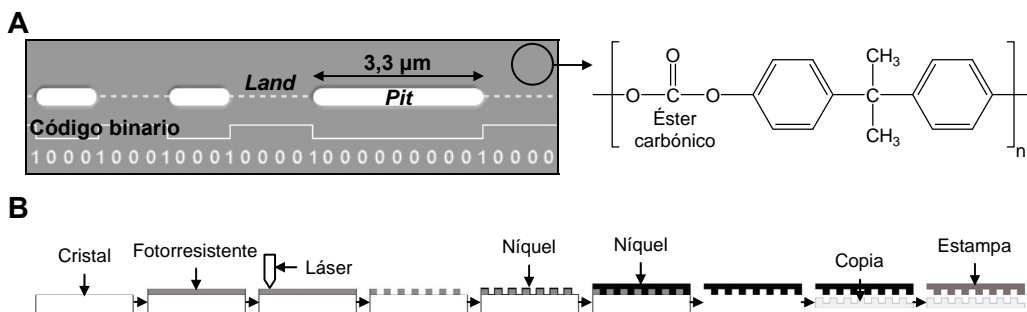


Fig. 1.11. Representación de los *pits* y los *lands* grabados en el policarbonato de BPA (A) y esquema del proceso de fabricación de la estampa utilizada para imprimir los *pits* en el policarbonato fundido (B). Adaptado de <http://www.pccomparativas.com/apunte.php?apunte=6> y de Emmelius *et al.* (1989), respectivamente.

Los CD incluyen tan sólo una capa de policarbonato de 1,2 mm de espesor, mientras que los DVD y los HD-DVD presentan dos láminas de 0,6 mm. Los BD constan de una capa de policarbonato de 1,1 mm, sobre la que se deposita otra de tan sólo 0,1 mm (**Fig. 1.12**). Como se ha mencionado anteriormente, se han diseñado diferentes tipos de DVD pregrabados (DVD 5/10/9/14/18), que se diferencian principalmente en el número de superficies de lectura (1-4) y por tanto en su capacidad (4,7-17 GB). Los HD-DVD presentan la misma estructura que los DVD, pero sus *pits* y *lands* son más reducidos. Con los BD y los HD-DVD se utilizan láseres de la misma longitud de onda (405 nm), pero la apertura numérica de estos últimos es inferior (0,85 y 0,65, respectivamente).

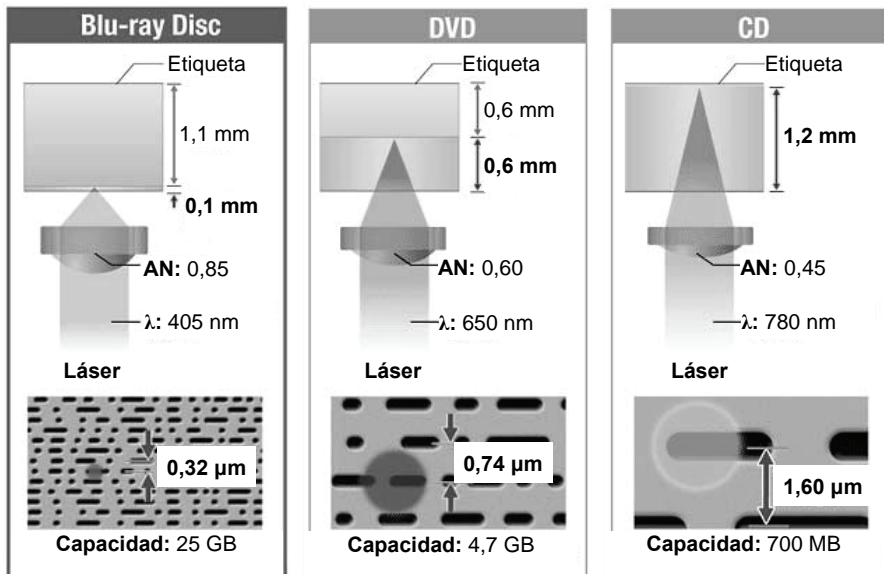


Fig. 1.12. Principales diferencias entre CD, DVD y BD. AN, apertura numérica. Adaptada de <http://thefutureofthings.com/articles/56/mempile-terabyte-on-a-cd.html>.

1.3.3.2. Discos grabables y regrabables

La fabricación de un CD-R se inicia con la impresión, en una de las superficies del policarbonato, de un surco continuo y concéntrico. Éste tiene forma de U, con una profundidad y una anchura aproximada de 180 y 670 nm, respectivamente (**Fig. 1.10B**). Este proceso se lleva a cabo mediante moldeo por inyección. La estampa utilizada, se genera de forma similar a la de los discos pregrabados (**Apartado 1.3.3.1**). Sobre la superficie excavada del plástico se deposita la capa de colorante. Ésta presenta un espesor diferente en los surcos y en las superficies restantes (150 y 40 nm, respectivamente). Finalmente, se deposita la capa metálica, la de laca y una etiqueta identificativa opcional.

El colorante permite la grabación de los datos, debido a que absorbe la radiación del láser y genera calor. Como consecuencia, se destruyen localmente sus moléculas de forma irreversible y además se funde el policarbonato y se deforma el metal adyacente (Mustroph *et al.*, 2006). Los puntos expuestos al láser equivalen a los *pits* de los discos pregrabados (**Apartado 1.3.3.1**) y presentan menos reflexión que las regiones intactas. El plástico sirve de soporte y además el surco guía al láser. Éste atraviesa el policarbonato (desde la superficie sin surcos) hasta la capa metálica depositada sobre el colorante. A continuación, la luz reflejada por el metal se recoge en el fotodetector del equipo electrónico.

Los discos regrabables también incluyen una lámina de policarbonato con un surco continuo, que presenta la misma finalidad. Sin embargo, estos discos no incluyen un colorante termosensible. En ellos, la capa que almacena la información consiste en una aleación de varios elementos (Sb, Te, Ag y In). Su estado (cristalino o amorfo) determina la intensidad de la reflexión detectada por el equipo electrónico. Se comercializan diferentes tipos de discos regrabables (CD-RW, DVD-/+RW), que presentan diferentes variantes de las marcas excavadas en el policarbonato para direccionar al láser (Mustroph *et al.*, 2006).

1.3.4. Degradación de discos ópticos

Antes de la aparición en el mercado de los discos ópticos ya se habían utilizado diferentes soportes para almacenar, utilizar y transmitir la información (p. ej., papiro, pergamino, papel, fotografía, cinta magnética, discos de vinilo). Todos están constituidos principalmente de materiales orgánicos, muchos de ellos poliméricos como la celulosa, el colágeno o los plásticos sintéticos. Esto explica que todos ellos sean susceptibles de deterioro químico, físico y biológico y, por tanto, es conveniente estudiar los procesos de degradación y determinar los métodos adecuados de conservación (Cappitelli y Sorlini, 2005; Cappitelli y Sorlini, 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, la principal materia prima de los discos ópticos es el policarbonato de BPA. Cabe destacar, que este polímero es el policarbonato aromático más ampliamente utilizado. Los policarbonatos alifáticos son biodegradados fácilmente. Sin embargo, el enlace carbonato en los polímeros aromáticos es más recalcitrante (Artham y Doble, 2008) aunque en los últimos años se han publicado algunos estudios relacionados con su biodegradación. Sivalingam y Madras (2004) demostraron, utilizando cromatografía de exclusión molecular, que diferentes lipasas (EC 3.1.1.3) son capaces de hidrolizar este plástico. Estas hidrolasas, como los demás tipos de esterases (EC 3.1.1), actúan sobre los enlaces éster, lo que explica su actividad sobre el policarbonato. Recientemente, Artham y Doble (2009) han descrito la biodegradación de este polímero *in vivo* e *in vitro*, en condiciones oceánicas. En estos estudios, los biofilms adheridos al policarbonato produjeron la oxidación y/o hidrólisis del plástico, según los análisis realizados con diferentes técnicas. En el cultivo *in vitro*, se detectó BPA y varios productos resultantes de la oxidación de este compuesto. Además, se aisló una cepa de *Pseudomonas* sp. con actividad hidrolítica sobre lípidos y almidón. En otros estudios similares, se observó también la biodegradación de policarbonato y otros polímeros sintéticos, mediante la formación de biofilms (Artham *et al.*, 2009). En cuanto a la capacidad de las especies fúngicas para actuar sobre el policarbonato de BPA, se

han publicado, hasta el momento, pocos estudios. En el año 2001, se demostró que el policarbonato de los CD puede ser degradado por el hongo objeto de esta Tesis doctoral, que se aisló de un CD encontrado en Belice, un pequeño país de América Central con temperaturas en torno a 30 °C y un 90% de humedad (García-Guinea *et al.*, 2001). Posteriormente, se ha comprobado que el basidiomiceto ligninolítico *P. chrysosporium* y dos especies de ascomicetos, son también capaces de degradar este plástico (**Fig. 1.13A y B**) (Artham y Doble, 2010) aunque en los cultivos de estos hongos no se detectó BPA, como producto de biodegradación, y los niveles de actividad lipasa fueron bajos. Los resultados obtenidos, en este estudio, indicaron además que el proceso de biodegradación se puede facilitar mediante pretratamientos térmicos o con luz UV.

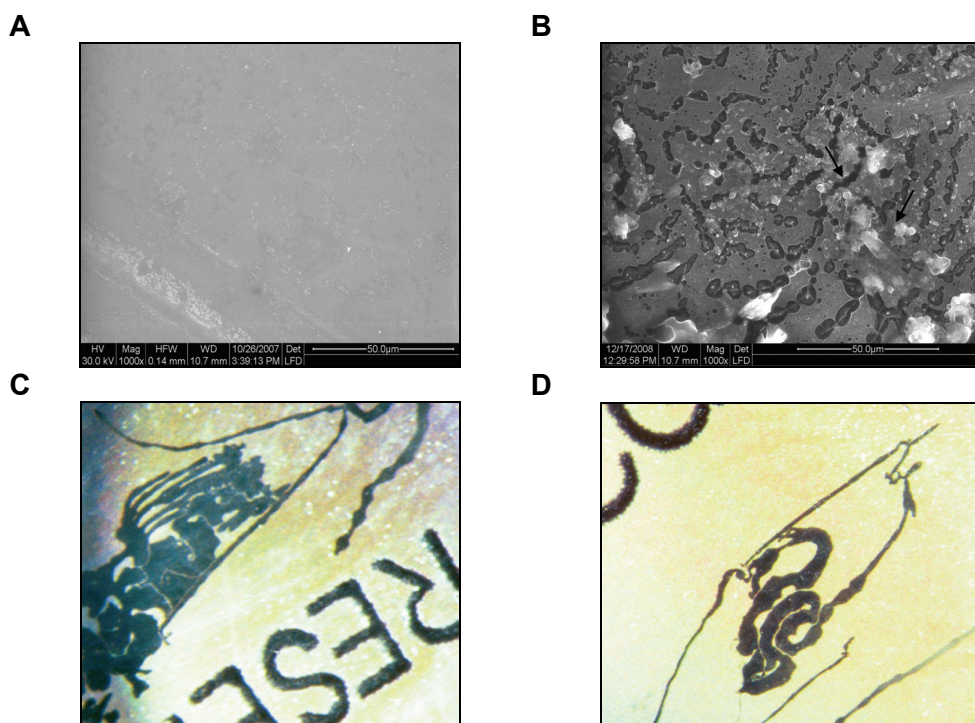


Fig. 1.13. Biodegradación de policarbonato (A y B) y de CD (C y D). A y B) Policarbonato incubado durante 12 meses en ausencia (A) y presencia (B) de *P. chrysosporium*. Las imágenes son de microscopía electrónica de barrido (*scanning electron microscopy*, SEM) y se obtuvieron de Artham y Doble (2010). C y D) Signos de biodegradación presentes en diferentes fragmentos de un CD-A encontrado en Costa Rica. Imágenes obtenidas con una lupa (6x).

En la **Fig. 1.14** se muestra el CD-A biodegradado que se encontró en Belice. En este CD se observa, a simple vista, que el deterioro comenzó en el borde y que afectó considerablemente a la capa metálica reflectora. Un análisis de

diferentes fragmentos de este CD, mediante microscopía óptica y electrónica, reveló que la capa de policarbonato estaba también biodegradada (especialmente en las regiones adyacentes a las hifas). Para aislar el microorganismo responsable de la degradación, se esterilizaron fragmentos de este disco superficialmente y se incubaron en medios sólidos con agar Malta. Como resultado, se aisló una única colonia fúngica que se relacionó con el género *Geotrichum* Link, en base a sus características morfológicas macroscópicas y microscópicas (García-Guinea *et al.*, 2001).

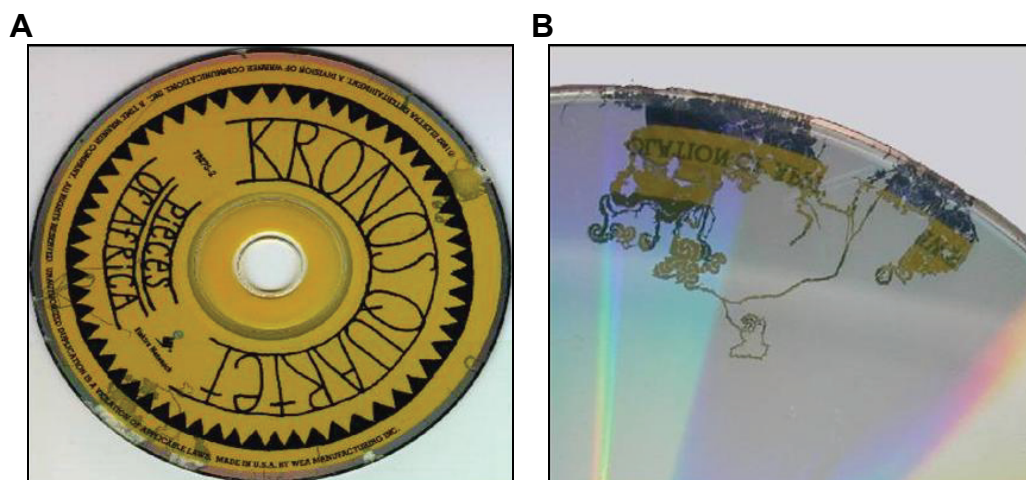


Fig. 1.14. CD-A biodegradado completo (A) y un detalle de una región próxima al borde (B). Este CD se encontró en Belice y contiene la música del grupo *Kronos Quartet* (*Elektra Entertainment of Warner Communications*). Obtenidas de García-Guinea *et al.* (2001).

En el Museo de Ciencias Naturales del CSIC han sido recogidas muestras de otros CD biodeteriorados *in vivo*, procedentes de Guatemala, México, Panamá, Costa Rica y Hong Kong (García-Guinea *et al.*, 2001). Éstas presentan un patrón de degradación similar al del CD-A encontrado en Belice, pero, hasta el momento, no se han estudiado los organismos responsables de su deterioro (Fig. 1.13C y D). La elevada humedad y temperatura de estas regiones, probablemente favoreció el proceso de colonización de los CD. Esto es consistente con los resultados que se presentarán posteriormente en esta Tesis doctoral (Romero *et al.*, 2007) y también con los resultados que obtuvieron Slattery *et al.* (2004) incubando varios CD/DVD-R en cámaras con diferentes valores de temperatura y de humedad. En este último estudio también se constató que la exposición prolongada y directa de luz tiene un efecto negativo en los discos y que su estabilidad frente a los tres agentes mencionados varía considerablemente según

el fabricante. Recientemente, otro estudio ha demostrado que la luz puede deteriorar completamente la capa de colorante de los CD-R (Rollet *et al.*, 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, los diferentes tipos de discos ópticos tienen una composición similar. Esto sugiere que las especies fúngicas capaces de deteriorar CD-A podrían afectar a los otros tipos de discos. Además, la biodegradación de los DVD y los BD podría ser más factible, puesto que el espesor de una de las dos capas de policarbonato, que contienen estos discos, es más reducido que el de los CD (0,6, 0,1 y 1,2 mm, respectivamente; **Fig. 1.12**). La reducción de la distancia, entre la superficie de lectura y el objetivo del equipo electrónico, implica un incremento de la apertura numérica. Esto se traduce en un aumento de la capacidad del disco, pero también de su fragilidad y susceptibilidad a las ralladuras, que podrían facilitar la colonización fúngica en un ambiente húmedo y cálido. Para prevenir el deterioro de los discos ópticos, se están desarrollando continuamente nuevas patentes, relacionadas con la utilización de materiales más resistentes o métodos de fabricación más eficaces.

1.4. OBJETIVOS

Este trabajo está centrado en el estudio de la especie fúngica aislada del CD encontrado en Belice, incluida inicialmente en el género *Geotrichum* (**Apartado 1.3.4**), así como en diferentes enzimas secretadas por este hongo. Los objetivos planteados se exponen brevemente a continuación:

1. Completar la identificación de la especie fúngica aislada del CD, en base a sus características morfológicas, macroscópicas y microscópicas, y utilizando técnicas moleculares.
2. Estudiar *in vitro* la capacidad del hongo aislado para colonizar diferentes tipos de CD y para degradar los principales materiales que constituyen los discos ópticos (policarbonato, metales y colorantes).
3. Estudiar la capacidad del hongo aislado para producir enzimas que podrían estar implicadas en la degradación de los diferentes componentes de los CD (oxidorreductasas ligninolíticas y esterases).
4. Caracterizar, desde un punto de vista bioquímico y molecular, las enzimas más relevantes secretadas por el hongo aislado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PRODUCTOS COMERCIALES

La siguiente tabla incluye todos los productos comerciales utilizados en los ensayos que se describen en los apartados posteriores.

Tabla 2.1. Productos comerciales utilizados.

(A) Componentes de medios de cultivo	Nº CAS¹	Casa comercial
Agar	9002-18-0	<i>Pronadisa</i>
Almidón soluble	9005-84-9	<i>Merck</i>
Ampicilina	69-53-4	<i>Roche</i>
Borato de sodio decahidratado	1303-96-4	<i>Riedel-de Haën</i>
Cloranfenicol	56-75-7	<i>Sigma-Aldrich</i>
Cloruro cálcico	10043-52-4	<i>Sigma-Aldrich</i>
Cloruro de manganeso	7773-01-5	<i>Merck</i>
Cloruro potásico	7447-40-7	<i>Merck</i>
Cloruro sódico	7647-14-5	<i>Merck</i>
D(+)-Glucosa	50-99-7	<i>Merck</i>
Extracto de levadura <i>Difco</i> TM	8013-01-2	<i>BD Biosciences</i>
Extracto de malta <i>Bacto</i> TM	8002-48-0	<i>BD Biosciences</i>
Fosfato monopotásico	7778-77-0	<i>Merck</i>
Harina de soja <i>Hensel Voll-Soja</i>	-	<i>Schoeneberger GmbH</i>
Heptamolibdato amónico tetrahidratado	12054-85-2	<i>SERVA</i>
Peptona <i>Bacto</i> TM	73049-73-7	<i>BD Biosciences</i>
Sacarosa	57-50-1	<i>Merck</i>
Succinato de dimetilo	106-65-0	<i>Fluka</i>
Sulfato cúprico pentahidratado	7758-99-81	<i>Merck</i>
Sulfato de zinc heptahidratado	7446-20-0	<i>Merck</i>
Sulfato ferroso heptahidratado	7782-63-01	<i>J. T. Baker</i>
Sulfato magnésico heptahidratado	10034-99-8	<i>Merck</i>
Tartrato amónico dibásico	3164-29-2	<i>Fluka</i>
Triptona <i>Bacto</i> TM	91079-40-2	<i>BD Biosciences</i>
Zumo de tomate	-	<i>Albi & Co</i>
(B) Componentes de soluciones y disolventes		
Acetato sódico	127-09-3	<i>Merck</i>
Acetona	67-64-1	<i>Merck</i>
Acetonitrilo	75-05-8	<i>LAB-SCAN</i>
Ácido acético	64-19-7	<i>Merck</i>
Ácido cítrico	77-92-9	<i>Merck</i>
Ácido clorhídrico	7647-01-0	<i>Merck</i>
Ácido etilen-diaminotetraacético (EDTA)	60-00-4	<i>Merck</i>
Ácido málico	6915-15-7	<i>Merck</i>
Ácido <i>N</i> -2-hidroxiethylpiperacina- <i>N'</i> -2-etanosulfónico (HEPES)	7365-45-9	<i>SERVA</i>
Ácido nítrico	7697-37-2	<i>Merck</i>
Ácido ortobórico	10043-35-3	<i>Merck</i>
Ácido ortofosfórico	7664-38-2	<i>Merck</i>
Ácido oxálico	144-62-7	<i>Sigma-Aldrich</i>

Tabla 2.1. (Continuación).

(B) Componentes de soluciones y disolventes	N° CAS	Casa comercial
Ácido piperacín- <i>N,N'</i> -bis(2-etanosulfónico) (PIPES)	5625-37-6	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ácido <i>p</i> -morfolino propano sulfónico (MOPS)	1132-61-2	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ácido succínico	110-15-6	<i>Merck</i>
Ácido sulfúrico	7664-93-9	<i>Merck</i>
Ácido tartárico	147-71-7	<i>Merck</i>
Acrilamida/ <i>N, N'</i> -metilenbisacrilamida (bis)	79-06-1	<i>Bio-Rad</i>
Agarosa D-1 ME	9012-36-6	<i>Pronadisa</i>
Albúmina de suero bovino (BSA)	9048-46-8	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol isoamílico	123-51-3	<i>Merck</i>
Arseniato disódico heptahidratado	10048-95-0	<i>Riedel-de Haën</i>
Bicarbonato sódico	144-55-8	<i>Merck</i>
BPA	-	<i>Bayer</i>
Bromuro de etidio	1239-45-8	<i>Fluka</i>
Carbonato sódico	497-19-8	<i>Panreac</i>
Cloroformo	67-66-3	<i>Merck</i>
Cloruro cálcico dihidratado	10035-04-8	<i>Merck</i>
Cloruro de magnesio	7786-30-3	<i>Merck</i>
Cloruro de manganeso tetrahidratado	13446-34-9	<i>Merck</i>
Dimetilsulfóxido (DMSO)	67-68-5	<i>Sigma-Aldrich</i>
Dodecil sulfato sódico (SDS)	151-21-3	<i>Merck</i>
Etanol	64-17-5	<i>Merck</i>
Fenol	108-95-2	<i>Sigma-Aldrich</i>
Formalina (con formaldehído 35%)	50-00-0	<i>Merck</i>
Formamida	75-12-7	<i>Merck</i>
Fosfato de sodio dibásico	10140-65-5	<i>Merck</i>
Fosfato de sodio monobásico dihidratado	13472-35-0	<i>Merck</i>
Glicerol	56-81-5	<i>Merck</i>
Glicina	56-40-6	<i>Merck</i>
Hidróxido sódico	1310-73-2	<i>Merck</i>
Isopropanol	67-63-0	<i>Merck</i>
<i>N, N, N', N'</i> -Tetrametiletilendiamina (TEMED)	110-18-9	<i>SERVA</i>
<i>N, N'</i> -Dimetilformamida	68-12-2	<i>Sigma-Aldrich</i>
Nitrato de plata	7761-88-8	<i>Merck</i>
Persulfato amónico	7727-54-0	<i>Bio-Rad</i>
Pirofosfato sódico decahidratado	13472-36-1	<i>Sigma-Aldrich</i>
Sulfato sódico	7757-82-6	<i>Panreac</i>
Tartrato de sodio y de potasio tetrahidratado	6381-59-5	<i>Riedel-de Haën</i>
Tetrahidrofurano	109-99-9	<i>ROMIL</i>
Tiosulfato sódico	7772-98-7	<i>Sigma-Aldrich</i>
Tris(hidroximetil)aminometano (Tris)	77-86-1	<i>MP Biomedicals</i>
Yoduro potásico	7681-11-0	<i>Sigma-Aldrich</i>
β -Mercaptoetanol	60-24-2	<i>Sigma-Aldrich</i>
(C) Colorantes		
<i>Acid blue 74</i>	860-22-0	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Acid blue 93</i>	28983-56-4	<i>Sigma-Aldrich</i>

Tabla 2.1. (Continuación).

(C) Colorantes	Nº CAS	Casa comercial
<i>Acid orange 52</i>	547-58-0	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Acid orange 7</i>	633-96-5	<i>Sigma-Aldrich</i>
Azul brillante Coomassie R-250	6104-59-2	<i>SERVA</i>
Azul de bromofenol	115-39-9	<i>Riedel-de Haën</i>
<i>Azure B</i>	531-55-5	<i>Sigma-Aldrich</i>
RB5	17095-24-8	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Reactive blue 19</i>	2580-78-1	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Reactive violet 5</i>	12226-38-9	<i>Sigma-Aldrich</i>
Sal tetrasódica de la tetrasulfonatoftalocianina de níquel (II)	27835-99-0	<i>Sigma-Aldrich</i>
Xilencianol	2650-17-1	<i>Merck</i>
(D) Sustratos y otros compuestos relacionados		
10-Acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (<i>Amplex[®] Red</i>)	119171-73-2	<i>Invitrogen</i>
ABTS	30931-67-0	<i>Roche</i>
DMP	91-10-1	<i>Fluka</i>
3,3'-Dimetoxibencidina (<i>o</i> -dianisidina)	119-90-4	<i>Sigma-Aldrich</i>
3-Cloro- <i>p</i> -anisaldehído	4903-09-7	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>p</i> -(Metoximetil)fenol	-	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>p</i> -Metoxibencilamina	2393-23-9	<i>Sigma-Aldrich</i>
5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal)	7240-90-6	<i>Roche</i>
Aceite de oliva	8001-25-0	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ácido <i>m</i> -clorobenzoico	535-80-8	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ácido 3-cloro- <i>p</i> -anisico	37908-96-6	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ácido <i>m</i> -fluorobenzoico	455-38-9	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ácido <i>p</i> -nitrobenzoico	62-23-7	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol bencílico	100-51-6	<i>Riedel-de Haën</i>
Alcohol cinamílico	104-54-1	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol coniferílico	458-35-5	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol isovainillílico	4383-06-6	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol <i>m</i> -anisílico	6971-51-3	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol <i>m</i> -clorobencílico	873-63-2	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol <i>m</i> -fluorobencílico	456-47-3	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol <i>p</i> -anisílico	105-13-5	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol <i>p</i> -clorobencílico	873-76-7	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol <i>p</i> -fluorobencílico	459-56-3	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol <i>p</i> -hidroxibencílico	623-05-2	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol <i>p</i> -metilbencílico	589-18-4	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol <i>trans</i> , <i>trans</i> -2,4-hexadien-1-ol	17102-64-6	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol vainillílico	498-00-0	<i>Sigma-Aldrich</i>
Alcohol veratrílico	93-03-8	<i>Sigma-Aldrich</i>
Bencilmetil éter	538-86-3	<i>Sigma-Aldrich</i>
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo (<i>p</i> NPB)	2635-84-9	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ditionito sódico	7775-14-6	<i>Merck</i>
Eugenol	97-53-0	<i>Sigma-Aldrich</i>

Tabla 2.1. (Continuación).

(D) Sustratos y otros compuestos relacionados		Nº CAS	Casa comercial
Isopropil- β -D-tio-galactósido (IPTG)		367-93-1	Calbiochem
<i>m</i> -Clorobenzaldehído		587-04-2	Sigma-Aldrich
Metanol		67-56-1	Merck
<i>m</i> -Fluorobenzaldehído		456-48-4	Sigma-Aldrich
<i>p</i> -Anisalaldehído		123-11-5	Sigma-Aldrich
Peróxido de hidrógeno		7722-84-1	Merck
<i>p</i> -Metilbenzalaldehído		104-87-0	Sigma-Aldrich
<i>p</i> -Nitrobenzalaldehído		555-16-8	Sigma-Aldrich
Sulfato de manganeso monohidratado		10034-96-5	SAFC
Sulfito sódico		7757-83-7	Merck
<i>trans</i> -Cinamalaldehído		14371-10-9	Sigma-Aldrich
Vainillina		121-33-5	Merck
(E) Enzimas, kits y soluciones comerciales		Nº Catálogo	
Alcohol oxidasa de <i>Pichia pastoris</i>		A2404	Sigma-Aldrich
AmpliTaQ DNA polymerase		N8080172	Applied Biosystems
AMV reverse transcriptase (RT)		M9004	Promega
Anfolitos Pharmalyte™	pH 3-10	17-0456-01	GE Healthcare
	pH 2,5-5	17-0451-01	
BigDye® Terminator v3.1		4337458	Applied Biosystems
Bio-Rad protein assay		500-0006	Bio-Rad
Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP)		U1515	Promega
DNA molecular weight marker	II	236250	Roche
	V	821705	
	VI	1062590	
EcoRV		667145	Boehringer
Endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (Endo H) de <i>Streptomyces plicatus</i>		11643053001	Roche
HaeIII de <i>Haemophilus aegypticus</i>		R0108T	New England Biolabs
HpyCH4III de <i>Helicobacter pylori</i>		R0618S	New England Biolabs
GENECLEAN® kit		1001-200	Q-BIOgene
Glucosa oxidasa de <i>A. niger</i> (tipo II)		G6125	Sigma-Aldrich
Low molecular weight gel filtration calibration kit		17-0442	Pharmacia
NucleoSpin® plasmid kit		740588	MACHEREY-NAGEL
HRP (grado EIA)		9003-99-0	Roche
pGEM®-T Easy vector system I		A1360	Promega
MALDI-MS protein calibration standard II		207234	Bruker
Ribonucleasa A pancreática		109126	Boehringer
SDS-PAGE molecular weight standards	Low	161-0304	Bio-Rad
	High	161-0303	
T4 DNA polymerase		M4211	Promega
Ultraspec™ RNA isolation system		BL10500	Biotech

¹ Número CAS, identificación numérica asignada por el Chemical Abstracts Service, que es una división de la Sociedad Química Americana.

2.2. MICROORGANISMOS Y VECTORES

2.2.1. Cepas fúngicas

El presente trabajo se ha centrado en el estudio de un anamorfo de *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst. aislado de un CD-A encontrado en Belice (América Central) (García-Guinea *et al.*, 2001). Este hongo está depositado en la colección Instituto Jaime Ferrán de Microbiología (IJFM) del CIB, identificado como IJFM A-757.

Se han utilizado también otras dos cepas de *B. adusta* para comparar con el anamorfo aislado del CD-A: **i)** *B. adusta* del *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) *Fungal Biodiversity Centre* (CBS 230.93 = IJFM A-786); y **ii)** *B. adusta* TM Ud1, de la colección del Instituto de Microbiología de la Universidad de Jena (Alemania).

2.2.2. Cepa bacteriana

La cepa de *E. coli* DH5 α se utilizó para mantener y replicar vectores recombinantes. El genotipo de este procariota es: *supE44*, Δ *lacU169*(Φ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*.

2.2.3. Vector

Se utilizó el vector *pGEM-T Easy* para clonar el gen que codifica la AAO del anamorfo de *B. adusta* (Fig. 2.1). Este plásmido se comercializa digerido con *EcoRV* y con una T en ambos extremos 3'. La incorporación de la T previene la recircularización del vector y permite la inserción de fragmentos de ADN con una A en ambos extremos 3'. Los promotores de las T7 y SP6 ARN polimerasas flanquean el sitio de clonación múltiple, que se encuentra incluido en la región que codifica para el péptido- α de la β -galactosidasa. El vector también incluye como marcador de selección el gen que codifica la enzima β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina.

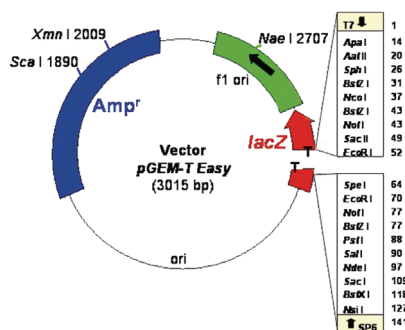


Fig. 2.1. Vector de clonación *pGEM-T Easy*.

2.3. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo se enrasaron con H₂O destilada y se autoclavaron a 120 °C durante 20 minutos o a 110 °C durante 30 minutos si contenían glucosa.

2.3.1. Medios de cultivo fúngicos

- *Medios sólidos con diferentes azúcares:* sirvieron para estudiar la velocidad de crecimiento del anamorfo de *B. adusta* en presencia de distintas fuentes de carbono.

Tabla 2.2. Medios con diferentes azúcares.

Componente	g/L
Extracto de malta, glucosa, sacarosa o almidón	10
Agar	10
El medio con glucosa, se preparó en ausencia y presencia de peptona (5g/L) y extracto de levadura (2,5 g/L).	

El medio con extracto de malta se preparó también a la concentración indicada en la siguiente tabla para aislar el anamorfo de *B. adusta*, reproducir la colonización de CD *in vitro* y conservar las especies fúngicas.

Tabla 2.3. Medio agar malta.

Componente	g/L
Extracto de malta	20
Agar	20

- *Medio agar patata:* se utilizó para estudiar la morfología del anamorfo de *B. adusta*.

Tabla 2.4. Medio agar patata.

Componente	g/L
Agar	20
	ml/L
Extracto de patata	200
Para preparar el extracto de patata, se autoclavaron patatas peladas y troceadas en H ₂ O (500 g/L, 110 °C, 30 min). A continuación, esta mezcla se filtró a través de una gasa para obtener una solución homogénea.	

- *Medios agar ABTS:* se utilizaron tres medios diferentes con ABTS para detectar actividad lacasa y/o peroxidasa. Estas enzimas oxidan el ABTS dando

lugar a la formación de un radical catiónico de color verde oscuro (ABTS^{•+}). Se prepararon cultivos con el hongo aislado del CD y con la cepa de *B. adusta* TM Ud1. Este método se utilizó únicamente como primera aproximación, puesto que no permite discernir entre las oxidorreductasas mencionadas. El ABTS se disolvió en etanol al 70% (v/v) y se agregó al medio autoclavado.

Tabla 2.5. Medio agar Kirk-ABTS (Hofrichter *et al.*, 1997).

Componente	g/L
Glucosa	10
Succinato de dimetilo	2,2
KH ₂ PO ₄	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
CaCl ₂	0,1
Tartrato amónico	0,25
Extracto de levadura	0,1
MnCl ₂	0,1
ABTS	0,25
Agar	22

Tabla 2.6. Medio agar harina de soja-ABTS.

Componente	g/L
Harina de soja	30
ABTS	0,25
Agar	20

Ajustar a pH 6,0 con HCl.

Tabla 2.7. Medio agar zumo de tomate-ABTS.

Componente	g/L
ABTS	0,25
Agar	20
	ml/L
Zumo de tomate	500

▪ *Medio Kimura* (Kimura *et al.*, 1990): en este medio se prepararon los cultivos líquidos del anamorfo de *B. adusta* para estudiar la degradación de CD y las enzimas extracelulares que produce. Se suplementó con MnSO₄·H₂O (0, 100, 500 y 1000 µM) y aceite de oliva (0, 0,5 y 1%) para inducir las peroxidasas y esterasas, respectivamente. En los ensayos de degradación de colorantes se preparó con agar (20 g/L; **Apartado 2.8.3.1**).

Tabla 2.8. Medio Kimura.

Componente	g/L
Glucosa	20
Peptona	5
Extracto de levadura	2
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5

Ajustar a pH 5,5 con NaOH.

- *Medio Czapek-Dox modificado* (Guillén *et al.*, 1992): se utilizó para estudiar la degradación de CD en cultivos líquidos del anamorfo de *B. adusta*.

Tabla 2.9. Medio Czapek-Dox modificado.

Componente	g/L
Glucosa	10
Tartrato amónico	2
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
Extracto de levadura	1
Peptona	5
	ml/L

Elementos traza (Tabla 2.10)

Ajustar a pH 5,1 con NaOH.

Tabla 2.10. Elementos traza del medio Czapek-Dox modificado.

Componente	g/L
B ₄ O ₇ Na ₂ ·10H ₂ O	0,1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,07
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,01

2.3.2. Medios de cultivo bacterianos

- *Medio Luria-Bertani (LB)* (Sambrook y Russell, 2001a): se empleó para mantener y cultivar *E. coli* DH5α. En algunos casos, este medio se enfrió (~ 50 °C) tras su esterilización y se suplementó con 1ml/L de una solución en agua de ampicilina (100 g/L) esterilizada por filtración (medio LB-Amp). Para realizar cultivos sólidos, se agregó 15 g/L de agar.

Tabla 2.11. Medio LB.

Componente	g/L
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

Ajustar a pH 7,0 con NaOH.

- *Medio super optimal broth (SOB)* (Hanahan, 1983): se utilizó para preparar células competentes de *E. coli* DH5 α .

Tabla 2.12. Medio SOB.

Componente	g/L
Triptona	20
Extracto de levadura	5
NaCl	0,5
	ml/L
KCl 250 mM	10

Añadir KCl después de que se disuelvan los demás compuestos y ajustar a pH 7,0 con NaOH. Inmediatamente antes de usar, agregar 5 ml de una solución autoclavada de MgCl₂ 2 M.

2.4. MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS

2.4.1. Mantenimiento y cultivo de hongos

- *Mantenimiento*: para el mantenimiento de las cepas de *B. adusta* se preparó el medio agar malta en tubos de agar inclinado. Éste se suplementó con cloranfenicol (50 μ g/ml) para prevenir contaminaciones bacterianas. Se conservaron a 4 °C o cubiertos con parafina a temperatura ambiente (24 °C) y se sembraron periódicamente.
- *Cultivo*: los cultivos fúngicos se realizaron en los diferentes medios sólidos y líquidos que se describen en el **Apartado 2.3.1**. Los sólidos se prepararon en placas de Petri de 90 ó 150 mm y los líquidos en matraces Erlenmeyer con una relación 1/5 entre el volumen del líquido y la capacidad del recipiente. Se incubaron generalmente a 28 °C y, para los cultivos en matraces, se utilizó un agitador orbital a 150 rpm.
- *Obtención de inóculos*: los cultivos en agar inclinado conservados a 4 °C sirvieron para inocular los preinóculos con un asa de siembra. Éstos se prepararon en los mismos medios y se incubaron (7-9 días) en las mismas condiciones que los correspondientes cultivos a inocular. Los preinóculos

líquidos se trituraron con un *Omni-Mixer 17150* (Sorvall; 1 min a velocidad media) y el volumen de inóculo fue un 0,5% del volumen contenido en el matraz a inocular. El inóculo para cultivos sólidos fue un fragmento del preinóculo de 0,6 x 0,6 mm.

2.4.2. Mantenimiento y cultivo de bacterias

- *Mantenimiento*: se conservaron a -80 °C *stocks* de *E. coli* DH5α con el plásmido recombinante y sin él durante tiempos prolongados. Para prepararlos se realizaron cultivos líquidos de LB-Amp inoculados con una colonia aislada. Tras su incubación (14 h, 100 rpm, 37 °C), se mezclaron 0,85 ml con 0,15 ml de una solución autoclavada de glicerol al 85% (v/v). Finalmente, la mezcla se congeló con N₂ líquido para almacenarse.

- *Cultivo*: *E. coli* DH5α se cultivó generalmente en medio LB líquido o sólido, a 37 °C durante 14 h. Los cultivos líquidos se realizaron en tubos de plástico de 50 ml con 30 ml de medio a 100 rpm. Para los sólidos se utilizaron placas de Petri de 90 mm con 30 ml de medio.

Para preparar células competentes se utilizó el medio SOB en matraces de 1 L con 250 ml de medio. Se incubaron a 100 rpm y 18 °C hasta que alcanzaron una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0,55 (**Apartado 2.6.7**).

- *Obtención de inóculos*: se utilizaron tres tipos de inóculos bacterianos:

- *Colonia aislada*: se aisló mediante agotamiento por estría en medio LB-Amp (16-20 h, 37 °C). Sirvió para inocular el preinóculo utilizado para preparar células competentes (**Apartado 2.6.7**). Este preinóculo se preparó en un matraz de 250 ml con 25 ml de LB y se incubó a 250-300 rpm durante 6-8 h a 37 °C.

- *Cultivo bacteriano líquido*: se trata de las células transformadas resuspendidas en medio LB e incubadas (100 rpm, 1 h, 37 °C) para su recuperación. Se extiende con un asa de Drigalski sobre el agar a inocular (**Apartado 2.6.9**).

- *Cultivo bacteriano en placa*: masa bacteriana desarrollada a partir de una colonia portadora de un plásmido recombinante. Sirve para inocular cultivos líquidos (**Apartado 2.6.9**).

2.5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Los ensayos espectrofotométricos, que se describen en los siguientes apartados, se llevaron a cabo a temperatura ambiente en un equipo *Shimadzu UV-160A*, si no se indica lo contrario.

2.5.1. Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas (c) se utilizó el *Bio-Rad protein assay*, basado en el método de Bradford (1976). Este reactivo es una solución ácida del colorante azul brillante Coomassie G-250 que al unirse a las proteínas experimenta un cambio en su máximo de absorción (de 465 a 595 nm). Se realizó el protocolo para microensayos, por triplicado y en cubetas de poliestireno. Las muestras (800 μ l) se mezclaron con el reactivo (200 μ l) por inversión y se incubaron (5 min). A continuación, se valoró su absorbancia a 595 nm y se interpoló en una recta de calibrado de BSA ($A_{595} = 0,0386 \cdot c$, rango lineal 1,2 a 10 μ g/ml, $R^2 = 0,995$).

2.5.2. Cuantificación de sustancias reductoras

Se utilizó el método de Somogyi-Nelson (1945) para determinar la concentración de azúcares reductores (con su OH anomérico libre) en cultivos fúngicos. Se basa en que, en condiciones alcalinas, el Cu^{2+} se reduce por el grupo aldehído del azúcar a Cu^+ . Este ión forma un precipitado (Cu_2O) que en presencia de Mo absorbe a 540 nm. La muestra (200 μ l) se incubó con el mismo volumen de una solución de Somogyi I-Somogyi II (4:1) (Tabla 2.13 y 2.14) en un baño a ebullición (15 min). A continuación, se enfrió para mezclarse con el reactivo de Nelson (200 μ l) (Tabla 2.15) y agua destilada (2,4 ml) en un agitador de tubos. Finalmente, los valores de absorbancia (A_{540}) de estas reacciones (3 réplicas) se interpolaron en una recta de calibrado de glucosa ($A_{540} = 0,6276 \cdot c$, rango lineal 0,06-1 mM, $R^2 = 0,998$). Los tres reactivos utilizados se conservan a temperatura ambiente en oscuridad.

Tabla 2.13. Somogyi I.

Componente	g/L
Na_2SO_4	180
$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15
Na_2CO_3	30
NaHCO_3	20

Tabla 2.14. Somogyi II.

Componente	g/L
Na_2SO_4	180
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	20

Tabla 2.15. Nelson.

Componente	g/L
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50
	ml/L
H_2SO_4	42
$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12% (p/v)	50

2.5.3. Determinación de pH

El pH se valoró con un pH-metro *Basic 20* (CRISON) calibrado con soluciones estándar de pH 4,01 y 7,0 (CRISON). El electrodo *Liq-Glass 238000* (Hamilton) se utilizó para medir el pH de soluciones y cultivos, mientras que para medir el gradiente de pH en geles de isoelectroenfoque se utilizó uno de superficie (52-07 CRISON).

2.5.4. Cálculo de coeficientes de extinción molar

Estas determinaciones se realizaron con un espectrofotómetro de dispositivo de fotodiodos *Hewlett-Packard 8453*, en cubetas de cuarzo (*Hellma*) de 1 ml y 1 cm de paso óptico (*l*).

2.5.4.1. Coeficientes de extinción molar de las MnP

Para determinar el coeficiente de extinción de las MnP purificadas (ϵ_{408}), se prepararon diferentes diluciones de estas hemoproteínas en tartrato 10 mM pH 5,0. En estas soluciones, la concentración de proteína se estimó con el *Bio-Rad protein assay* (Apartado 2.5.1). La masa molecular de las MnP se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Apartado 2.10.2). A continuación se valoró la absorbancia a 408 nm (máximo en la banda de Soret, A_{408}) y se aplicó la Ley de Lambert-Beer, que relaciona linealmente la absorbancia con la concentración de la especie absorbente ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$).

2.5.4.2. Coeficientes de extinción molar de aldehídos

Se calculó el coeficiente de extinción del coniferaldehído y del *p*-metilbenzaldehído para determinar las constantes cinéticas de la AAO utilizando los correspondientes alcoholes como sustratos. Los ensayos se realizaron a 338 y 261 nm con el coniferaldehído y el *p*-metilbenzaldehído, respectivamente. A estas longitudes de onda, los aldehídos presentan máximos de absorción y los alcoholes tienen valores de absorbancia despreciables. Para ello, se prepararon diluciones seriadas, en fosfato sódico 100 mM pH 6,0, de tres *stocks* de los aldehídos con concentraciones conocidas. A continuación, se valoró la absorbancia a la longitud de onda seleccionada y se aplicó la Ley de Lambert-Beer.

2.5.4.3. Coefficiente de extinción molar de la AAO

Para determinar el coeficiente de extinción de la AAO purificada, se valoró la absorbancia de la enzima en fosfato sódico 10 mM pH 6,0 a 463 nm (uno de los máximos de la proteína, A_{463}) y a continuación se liberó su cofactor (FAD) por tratamiento térmico en oscuridad (5 min, 80 °C). Tras retirar la apoproteína precipitada por centrifugación (10 min, 20238 g), se observó un máximo de absorbancia a 450 nm que corresponde al FAD liberado (A_{450}). Teniendo en cuenta que la concentración de proteína y de FAD es la misma, el coeficiente de extinción del FAD (ϵ_{FAD} 11300 M⁻¹·cm⁻¹) y el paso óptico de la cubeta, se calculó el coeficiente de extinción de la AAO a 463 nm (ϵ_{463}) utilizando la siguiente ecuación (Macheroux, 1999):

$$\epsilon_{463} = \epsilon_{FAD} \cdot A_{463} / A_{450} \quad (2.1)$$

2.5.5. Valoraciones enzimáticas

A continuación se describen los ensayos espectrofotométricos realizados para determinar diversas actividades enzimáticas. Las reacciones se prepararon en cubetas de cuarzo con un volumen final de 0,6 ó 1 ml. Se realizaron ensayos continuos de un minuto de duración y se utilizaron incrementos lineales de absorbancia (o descensos en el caso del RB5). Una unidad enzimática (U) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un μ mol de sustrato por minuto (International Union of Biochemistry, 1965).

2.5.5.1. Ensayos directos

Las condiciones para valorar actividades enzimáticas mediante ensayos directos se incluyen en la **Tabla 2.16**. Se determinaron estas actividades en muestras de cultivos líquidos o utilizando las oxidorreductasas purificadas (AAO o MnP). En esta sección se incluyen los sustratos típicos de las enzimas estudiadas y posteriormente se describirán ensayos con otros sustratos de la AAO y las MnP (**Apartados 2.11.1.1 y 2.12**, respectivamente).

2.5.5.2. Ensayos acoplados

Se realizaron ensayos acoplados en los que el H₂O₂, generada en reacciones catalizadas por la AAO, es utilizada por la HRP para oxidar un sustrato cromogénico. Estos ensayos sirvieron para determinar si la AAO presenta actividad metanol oxidasa y para calcular las constantes cinéticas de la AAO con varios aldehídos aromáticos y alcoholes. La **Tabla 2.17** incluye las condiciones utilizadas.

Tabla 2.16. Reacciones estándar de las actividades enzimáticas valoradas.

Actividad	Sustrato ¹	Producto	λ ²	ε ³	Tampón	Referencia
AAO	Veratrílico 10 mM	Veratraldehído	310	9300	Fosfato 100 mM pH 6,0	(Guillén <i>et al.</i> , 1992)
Peroxidasa ⁴ H ₂ O ₂ 0,1 mM	MnSO ₄ ·H ₂ O 0,1 mM	Mn ⁺³ -tartrato	238	6500	Tartrato 100 mM pH 5,0	(Martínez <i>et al.</i> , 1996)
	Veratrílico 10 mM	Veratraldehído	310	9300	Tartrato 100 mM pH 3,0	(Tien y Kirk, 1984)
	RB5 0,1 mM	RB5 ^{•+}	598	30000	Tartrato 100 mM pH 3,5	(Pérez-Boada <i>et al.</i> , 2005)
Lacasa	DMP 10 mM	Cerulignona	469	27500	Acetato 100 mM pH 5,0	(Muñoz <i>et al.</i> , 1997)
Esterasa	pNPB ⁵ 0,04 mM	p-Nitrofenol	346	4800	Tris-HCl 20 mM pH 7,2	(Calvo <i>et al.</i> , 1995)

¹En la Fig. 2.2 se muestran las estructuras químicas de los sustratos, a excepción del RB5 que se incluye en la Fig. 2.5.

²λ (nm), longitud de onda del ensayo, corresponde a un máximo de absorción del producto.

³ε (M⁻¹·cm⁻¹), coeficiente de extinción del producto calculado a la λ del ensayo. Únicamente en el caso del DMP, el ε se refiere al sustrato, y no a la cerulignona (3,3',5,5'-tetrametoxi-*p,p'*-difenoquinona).

⁴Se agregó EDTA 1 mM para confirmar la actividad peroxidasa independiente de Mn.

⁵pNPB, preparado en acetona.

En todos los casos se indican las concentraciones finales en la mezcla de reacción.

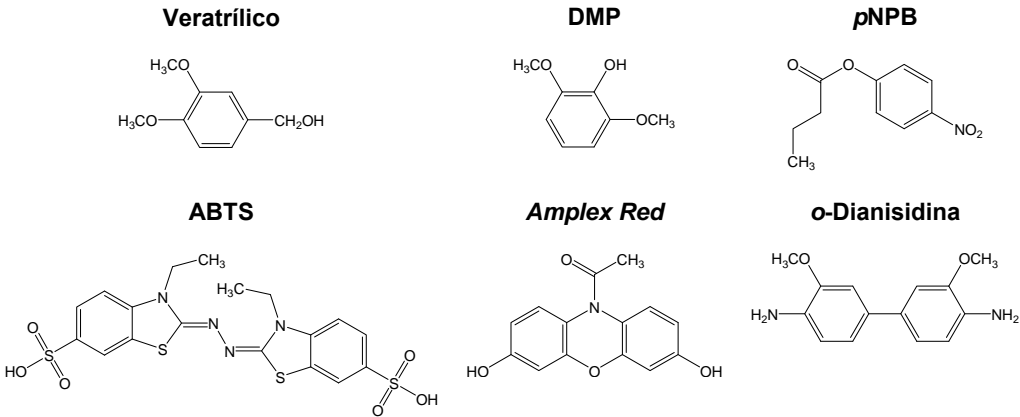


Fig. 2.2. Estructura química de sustratos utilizados en los ensayos directos o en los acoplados.

Tabla 2.17. Reacciones mediante ensayos acoplados.

Actividad	Sustrato AAO	Producto AAO	Sustrato HRP ¹	Producto HRP	λ^2	ϵ^3	Ref.
Metanol oxidasa ⁴	Metanol 0,033% (v/v)	Metanal H ₂ O ₂	ABTS 2 mM (HRP 3,6 U/ml)	ABTS ^{•+}	405	36800	(López y Cavaco-Paulo, 2008)
Aldehído oxidasa	Aldehído	Ácido H ₂ O ₂	<i>Amplex Red</i> ⁵ 58 μ M (HRP 26,7 U/ml)	Resorufina	563	52000	(Hassan-Abdallah <i>et al.</i> , 2005)
Aril-alcohol oxidasa	Alcohol	Aldehído H ₂ O ₂	<i>o</i> -Dianisidina ⁶ 358 μ M (HRP 17,8 U/ml)	<i>o</i> -Dianisidina oxidada	460	6765	(Wagner y Jorns, 2000)

¹En la Fig. 2.2 se muestran las estructuras químicas de los sustratos de la HRP.

² λ (nm), corresponde a un máximo de absorción del producto de oxidación de la HRP.

³ ϵ (M⁻¹·cm⁻¹), corresponde al producto de oxidación de la HRP, calculado a la λ del ensayo.

⁴La metanol oxidasa de *P. pastoris* se utilizó como control positivo.

⁵*Amplex Red*, preparado 20 mM, en DMSO.

⁶*o*-Dianisidina, disuelta en H₂O, en baño hirviendo.

En todos los casos se indican las concentraciones finales en la mezcla de reacción y se utilizó tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0 (y también pH 7,5 para metanol oxidasa). El *stock* comercial de la HRP presenta 1000 U/mg sobre ABTS y las unidades de HRP que se indican en los 3 ensayos se refieren a este sustrato.

2.6. TÉCNICAS MOLECULARES

Para todos los procedimientos que se describen a continuación se autoclavó el H₂O Milli-Q y el material (110 °C, 30 min), con objeto de evitar contaminaciones y la degradación de los ácidos nucleicos.

2.6.1. Extracción de ácidos nucleicos

En esta sección se incluyen los protocolos utilizados para extraer ADN y ARN de diferentes fuentes.

2.6.1.1. Aislamiento de ADN genómico de micelio

Se extrajo ADN genómico del anamorfo de *B. adusta* para su identificación molecular y para obtener la secuencia del gen de la AAO (**Apartados 2.7.2 y 2.13**, respectivamente). A continuación, se describe el procedimiento realizado utilizando 0,1 g de micelio (González *et al.*, 1992) y en las **Tablas 2.18, 2.19 y 2.20** se incluye la composición de las soluciones requeridas:

- *Obtención de micelio*: cultivar el hongo en medio líquido (50 ml, 150 rpm, 5 días, 28 °C). Filtrar al vacío el cultivo a través de papel de filtro, lavarlo con H₂O Milli-Q y liofilizarlo.
- *Rotura de membranas celulares*: pulverizar liofilizado con varilla de vidrio. Añadir 2,5 ml de HSE y 0,25 ml de SDS al 10% (p/v) e incubar (15 min, 65 °C).
- *Extracción de ADN con solventes orgánicos*: adicionar 2,5 ml de TEA y 5 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), centrifugar (12000 g, 10 min, 4 °C) y recoger la fase superior acuosa evitando arrastrar las proteínas precipitadas en la interfase. Repetir hasta obtener una fase acuosa limpia. Añadir 5 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), centrifugar (12000 g, 10 min, 4 °C) y recoger la fase superior.
- *Precipitación de ADN*: añadir 0,5 ml de acetato sódico 3 M pH 6,0 y 3 ml de isopropanol, agitar suavemente, incubar (30 min, 24 °C), centrifugar (6000 g, 10 min, 4 °C) y tirar el sobrenadante.
- *Eliminación de sales*: agregar 5 ml de etanol al 70% (v/v), centrifugar (6000 g, 10 min, 4 °C) y desechar el sobrenadante. Secar al vacío el precipitado y resuspender en TEB (30-100 µl).
- *Hidrólisis de ARN*: añadir 1 µl de ribonucleasa A pancreática por cada 100 µl de TEB e incubar (30 min, 37 °C). Preparar previamente ribonucleasa disuelta en Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y NaCl 15 mM (1mg/100 µl) y hervirla (15 min) para eliminar actividad desoxirribonucleasa.
- *Precipitación de ADN*: agregar 0,2 ml de acetato sódico 3 M pH 6,0 y 1,2 ml de isopropanol, centrifugar (6000 g, 5 min, 4 °C) y desechar el sobrenadante.
- *Eliminación de sales*: lavar el precipitado con 5 ml de etanol al 70%, centrifugar (6000 g, 10 min, 4 °C), tirar el sobrenadante y secar al vacío el precipitado.
- *Conservación*: resuspender en H₂O Milli-Q y mantener a -20 °C hasta su uso.

Tabla 2.18. Tampón HSE.

Componente	g/L
Sacarosa	171,15
	ml/L
Tampón HEPES 100 mM pH 6,9	200
EDTA 500 mM pH 8,0	40
Autoclavar (30 min, 110 °C).	

Tabla 2.19. Tampón TEA.

Componente	ml/L
Tris-HCl 1 M pH 8,0	50
EDTA 500 mM pH 8,0	40

Autoclavar (30 min, 110 °C).

Tabla 2.20. Tampón TEB.

Componente	ml/L
Tris-HCl 1 M pH 8,0	10
EDTA 500 mM pH 8,0	2

Autoclavar (30 min, 110 °C).

2.6.1.2. Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias

Para extraer plásmidos recombinantes de cultivos de *E. coli* DH5 α en LB-Amp se utilizó el *kit NucleoSpin plasmid* según el protocolo especificado por el fabricante. Con este método, los plásmidos fueron extraídos de las células, por lisis alcalina con SDS, tras la centrifugación de 30 ml de cultivo ($DO_{600} = 0,5$). Al neutralizar, el ADN plasmídico renaturaliza pero el bacteriano (de mayor masa molecular) precipita formando un complejo de ADN, proteínas, restos celulares y SDS que se elimina por centrifugación. El sobrenadante con los plásmidos se vierte en un tubo de centrifuga con una resina de sílice a la que se adhiere el ADN (en presencia de sales). Finalmente, tras lavado con una solución de etanol, se eluyen los plásmidos con H₂O Milli-Q por centrifugación.

2.6.1.3. Aislamiento de ADN de geles de agarosa y de soluciones

Para purificar ADN de geles de agarosa y de diversas reacciones, se empleó el *kit GENE CLEAN* siguiendo el manual de instrucciones. Este sistema, como el que se describe en el apartado anterior, también incluye una resina de sílice que une el ADN por atracción electrostática sólo en presencia de sales (en este caso NaI).

2.6.1.4. Aislamiento de ARN total de micelio

Se aisló ARN total del anamorfo de *B. adusta* para realizar RT-PCR (**Apartado 2.13.4**). Se realizó el protocolo descrito para la utilización del reactivo *Ultraspec RNA isolation system*. Esta solución incluye sales de guanidina y urea como agentes desnaturalizantes, además de fenol y varios detergentes. El procedimiento llevado a cabo se detalla a continuación:

- *Obtención de micelio*: cultivar el hongo en medio líquido (50 ml, 150 rpm, 5 días, 28 °C). Filtrar al vacío el cultivo a través de papel de filtro, lavarlo con H₂O Milli-Q y congelarlo a -80 °C. Confirmar previamente, valorando actividad AAO

en el líquido de cultivo, que se está expresando el gen de la AAO (**Apartado 2.5.5.1**).

- *Rotura de membranas celulares*: pulverizar el micelio en un mortero de porcelana (enfriado a -80 °C) con N₂ líquido. Agregar *Ultraspec RNA isolation system* (1 ml/10-100 mg de tejido), homogeneizar con el pistilo e incubar (5 min, 4 °C).
- *Extracción de ARN*: añadir cloroformo (0,2 ml/1 ml de *Ultraspec RNA isolation system*), agitar vigorosamente (15 s) e incubar (5 min, 4 °C). Centrifugar (12000 g, 15 min, 4 °C) y recoger fase superior acuosa (ADN y proteínas permanecen en la fase orgánica y en la interfase).
- *Precipitación de ARN*: agregar un volumen igual de isopropanol e incubar (10 min, 4 °C). Centrifugar (12000 g, 10 min, 4 °C) y desechar el sobrenadante.
- *Eliminación de sales*: adicionar etanol al 75% (1 ml/1 ml de *Ultraspec RNA isolation system*), mezclar con un agitador de tubos, centrifugar (7500 g, 5 min, 4 °C), tirar el sobrenadante, repetir lavado y secar al vacío el precipitado (5-10 min).
- *Conservación*: resuspender en H₂O Milli-Q (50-100 µl) y mantener a -20 °C hasta su uso.

2.6.2. Cuantificación y control de calidad de ácidos nucleicos

A continuación se explican dos metodologías para cuantificar y estimar la calidad de ADN y ARN.

2.6.2.1. Espectroscopia UV

Los ácidos nucleicos absorben luz UV a 250-270 nm debido a sus bases nitrogenadas. Esta propiedad permite cuantificarlos teniendo en cuenta que una DO₂₆₀ = 1 corresponde a una concentración de ADN de 50 µg/ml, de ARN de 40 µg/ml y de oligonucleótidos de 20 µg/ml. También posibilita la estimación del grado de pureza, siendo necesario reprecipitar los ácidos nucleicos si la relación A_{260}/A_{280} no es de 1,8-2,0 (valores inferiores indican contaminación con proteínas y superiores presencia de cloroformo o fenol). Estas determinaciones se realizaron en H₂O Milli-Q utilizando un espectrofotómetro *Shimadzu UV-160A* y cubetas de cuarzo de 1 ml.

2.6.2.2. Electroforesis en gel de agarosa

Este método es esencial para determinar si el ADN genómico y el ARN total, se han degradado durante su extracción. También permite confirmar las

estimaciones de concentración realizadas con el espectrofotómetro, además de separar productos de PCR y determinar su masa molecular. Se prepararon geles horizontales y se aplicó un voltaje de 50-100 V. En la **Tabla 2.21, 2.22, 2.23, 2.24 y 2.25** se incluye la composición de los tampones y de los geles utilizados. Las electroforesis de ARN se realizaron en condiciones desnaturalizantes (Sambrook *et al.*, 1989). Tras la electroforesis, los ácidos nucleicos, unidos a bromuro de etidio (agente intercalante y fluorescente), fueron visualizados mediante un transiluminador UV (*Gel Doc XR, BIO-RAD*). Se calculó la concentración de los fragmentos de ADN por comparación con marcadores de masa molecular (*DNA molecular weight marker: II*, 0,1-23,1 kb; *V*, 0,01-0,5 kb; y *VI*, 0,15-2,17 kb).

Tabla 2.21. Tampón TAE 50x para electroforesis de ADN.

Componente	g/L
Tris-base	242,3
	ml/L
Ácido acético	57,2
EDTA 0,5 M pH 8,0	100

Autoclavar (30 min, 110 °C). Es el tampón de carrera y el del gel. Se conserva a temperatura ambiente y se puede reutilizar.

Tabla 2.22. Gel para electroforesis de ADN.

Componente	g/L	2%
	0,8%	
Agarosa	8	20
	ml/L	
Tampón TAE 1x	1000	
Bromuro de etidio	0,1	

Disolver agarosa calentando hasta que hierva, enfriar a 50 °C y agregar bromuro de etidio. Verter en la bandeja de electroforesis (con el peine y los laterales sellados con cinta adhesiva) y dejar polimerizar.

Tabla 2.23. Tampón MOPS 10x para electroforesis de ARN.

Componente	g/L
MOPS	41,9
CH ₃ COONa	10,9
	ml/L
EDTA 0,5 M pH 8,0	20

Disolver CH₃COONa, añadir MOPS, ajustar pH a 7,0 y agregar EDTA. Esterilizar por filtración (0,2 µ) y conservar en oscuridad a temperatura ambiente. Es el tampón de carrera, el del gel y en el que las muestras se desnaturalizan. Se puede reutilizar.

Tabla 2.24. Gel para electroforesis de ARN.

Componente	g/L
Agarosa	12
	ml/L
Formaldehído 12,7 M	173
Tampón MOPS 10x	100

Disolver agarosa en agua calentando hasta que hierva, enfriar a 60 °C y agregar el resto de componentes. Verter en la bandeja de electroforesis (previamente tratada 14-16 h con SDS 0,2 M y EDTA 5 mM pH 8,0, dispuesta con el peine y sellada) y dejar polimerizar.

Tabla 2.25. Tampón de muestra de electroforesis de ADN y ARN.

Componente	g/L
Xilencianol	2
Azul de bromofenol	1
	ml/L
Glicerol 85% (v/v)	590
EDTA 0,5 M pH 8,0	100

Añadir a la muestra en una relación 1:5. Las muestras de ARN (10 µg) fueron previamente desnaturalizadas por tratamiento térmico (10 min, 65 °C, volumen final 30 µl) con formamida (12,5 µl), formaldehído (4 µl de solución 33%, v/v), tampón MOPS (2,5 µl de 10x) y bromuro de etidio (1 µl) (se enfriaron en hielo antes de añadir el tampón de muestra).

2.6.3. Amplificación de ADN

Se amplificaron fragmentos de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (*PerkinElmer*). Se prepararon reacciones (volumen final 50 µl) en tampón de PCR 1x con dos finalidades diferentes:

- *Identificación molecular del hongo aislado (Apartado 2.7.2)*: se agregó 1 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 1 µM de cada *primer*, 1,2 U de Taq ADN polimerasa y 200 ng de ADN genómico. Se aplicó un ciclo inicial de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 40 s a 52 °C y 1 min a 72 °C y finalmente un ciclo de elongación de 10 min a 72 °C.
- *Clonación del gen de la AAO (Apartado 2.13)*: se utilizó como molde ADN genómico (119/460 ng) o plasmídico (50 ng). La reacción incluía además MgCl₂ 2 mM, dNTP 250 µM, 2,5 U de Taq ADN polimerasa y los *primers* a la concentración final y temperatura de hibridación (*T_h*) que se indica en cada reacción. El programa de amplificación incluyó un ciclo de 2 min a 94 °C, 1 min a la *T_h* correspondiente y 2 min a 72 °C, seguido de 30 ciclos de 35 s a 94 °C, 1 min a la *T_h* y 2 min a 72 °C y para finalizar un ciclo de 10 min a 72 °C.

Los *primers* (19-26 nucleótidos) fueron sintetizados en el servicio de Química de Proteínas del CIB. Las parejas de cada reacción se diseñaron con similar temperatura de fusión [$T_m = 2^{\circ}\text{C} \cdot (\text{A} + \text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \cdot (\text{G} + \text{C})$] y se agregaron a la misma concentración. Se procuró que tuvieran un contenido en G/C del 40-60% y que no incluyeran en el extremo 3' ni una T final ni tres o más G/C seguidas.

2.6.4. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción son una herramienta esencial para el método de paseo cromosómico (*genome walking*) utilizado en la clonación de la AAO (**Apartado 2.13.2**). Se seleccionaron con el programa *NEBcutter V2.0* (New England Biolabs) que localiza los sitios de restricción incluidos en cada secuencia de ADN. Se prepararon reacciones (50 μl) con 1-3 μg de ADN genómico y 5-10 U de enzima/ μg , en el tampón 1x suministrado con la endonucleasa. La **Tabla 2.26** especifica las condiciones de incubación y el tipo de extremos generados.

Tabla 2.26. Enzimas y condiciones de restricción.

Endonucleasas	T ($^{\circ}\text{C}$)	BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ¹	Extremos
<i>Hae</i> III	37	-	Romos
<i>Hpy</i> CH4III	37	-	Cohesivos
<i>Eco</i> RV	37	0,1	Romos

¹Se indica la concentración final de BSA.

No exceder glicerol 5% en la reacción (enzima comercializada al 50%). Mezclar muy bien por pipeteo e incubar 14-16 h (o 3,5 h con *Hpy*CH4III). Detener las reacciones por congelación o por extracción utilizando el *kit* *GENECLEAN*.

2.6.5. Obtención de fragmentos de restricción con extremos romos a partir de extremos cohesivos

Para clonar los fragmentos de restricción en el vector *pGEM-T Easy* es necesario que presenten extremos romos (previamente a la incorporación de la A en 3'; **Apartado 2.6.6**). Se utilizó la ADN polimerasa del bacteriófago T4 para eliminar extremos cohesivos en 5' y 3' mediante su actividad 5'→3' polimerasa y 3'→5' exonucleasa, respectivamente. Los fragmentos de restricción se incubaron (5 min, 37 $^{\circ}\text{C}$) con la polimerasa (5 U/ μg ADN), 100 μM de cada dNTP (también para eliminar extremos 3' porque evitan despolimerización de la cadena duplexa) y el tampón 1x suministrado con la enzima (volumen final 50 μl). La reacción se detuvo por tratamiento térmico (10 min, 75 $^{\circ}\text{C}$).

2.6.6. Ligación de fragmentos de ADN

Se utilizó la ADN ligasa del fago T4 (3 U/reacción) para catalizar la formación de enlaces fosfodiéster entre fragmentos de restricción o productos de PCR y el vector *pGEM-T Easy* (50 ng/reacción). Las reacciones (10 µl) se incubaron 14-16 h a 4 °C para obtener el máximo número de moléculas recombinantes. El tampón y los demás componentes se incluyen en el *kit pGEM-T Easy vector system I*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la enzima Taq ADN polimerasa, que a diferencia de otras polimerasas, incorpora un nucleótido de adenina en ambos extremos 3' del producto de PCR posibilitando su inserción en el vector (que presenta T en ambos extremos 3'; **Apartado 2.2.3**). Sin embargo, para ligar fragmentos de restricción (con extremos romos) fue necesario incorporarles la A incubándolos (30 min, 70 °C) con tampón de PCR (1x), MgCl₂ (2,5 mM), dATP (0,2 mM) y Taq ADN polimerasa (5U). De esta reacción (10 µl), se utilizaron únicamente 2 µl en la ligación para evitar interferencias con sus componentes.

2.6.7. Preparación de células competentes de *E. coli* DH5α

Para la clonación del gen de la AAO, se prepararon células competentes de *E. coli* DH5α por el método desarrollado por Inoue *et al.* (1990). Este método es el resultado de optimizar las condiciones descritas por Hanahan (1983), siendo la modificación clave la disminución de la temperatura de cultivo de 37 a 18 °C. A continuación se detalla el protocolo realizado:

- *Elaboración del preinóculo*: se cultivó en medio líquido una colonia aislada, como se detalla en el **Apartado 2.4.2**.
- *Preparación de cultivos y monitorización de la DO*: inocular 3 matraces de 1 L con 250 ml de medio SOB utilizando un volumen de preinóculo diferente en cada matraz (10, 4 y 2 ml). Tras 14-16 h de cultivo (100 rpm, 18 °C), monitorizar la DO₆₀₀ cada 45 minutos hasta que uno de los matraces alcance 0,55 y continuar el protocolo sólo con ese matraz.
- *Desarrollo de la competencia*: incubar el cultivo en hielo (10 min), centrifugar (2500 g, 10 min, 4 °C), desechar el sobrenadante y secar las paredes del tubo de centrifuga con una torunda. Resuspender precipitado agitando suavemente en 80 ml del tampón de transformación Inoue (enfriado a 4 °C; **Tabla 2.27**). Centrifugar (2500 g, 10 min, 4 °C), tirar el sobrenadante y limpiar las paredes con una torunda.

- **Conservación:** resuspender precipitado en 20 ml del tampón de transformación Inoue (enfriado a 4 °C). Agregar 1,5 ml de DMSO, mezclar suavemente e incubar en hielo (10 min). Alicuotar (50 µl/tubo plástico 1,5 ml), sumergir en N₂ líquido y mantener a -80 °C hasta su uso.

Tabla 2.27. Tampón de transformación Inoue.

Componente	g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10,88
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,2
KCl	18,65
	ml/L
PIPES 0,5 M pH 6,7	20
Añadir PIPES después de que se disuelvan los demás compuestos y esterilizar por filtración (0,45 µm).	

2.6.8. Selección de bacterias portadoras de plásmidos recombinantes

E. coli DH5α presenta una delección parcial del péptido-α de la β-galactosidasa (*lacZ*ΔM15). Este marcador genético, en combinación con el vector *pGEM-T Easy* (**Apartado 2.2.3**), posibilitó la detección por complementación-α de bacterias con plásmidos recombinantes (Langley *et al.*, 1975). El *screening* se llevó a cabo en medio agar LB-Amp con X-gal (sustrato cromogénico de la β-galactosidasa) e IPTG (inductor). El X-gal se preparó en *N, N'*-dimetilformamida (20 g/L) y el IPTG en agua (200 g/L, esterilizado por filtración) para extenderse sobre la superficie del agar con un asa de Drigalski (40 y 4 µl, respectivamente).

2.6.9. Transformación de *E. coli* DH5α

Se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α para clonar el gen de la AAO. Se realizó por choque térmico siguiendo el método descrito a continuación (Sambrook y Russell, 2001b):

- **Homogeneización de las células con la reacción de ligación:** descongelar las células competentes (50 µl) en hielo (2 min). Agregar reacción de ligación (10 µl), mezclar suavemente e incubar en hielo (30 min).
- **Choque térmico:** incubar a 42 °C (90 s) e inmediatamente en hielo (2 min).
- **Recuperación de las células:** añadir 800 µl de LB e incubar (100 rpm, 1 h, 37 °C).
- **Cultivo:** repartir mezcla sobre la superficie de 3 placas de LB-Amp-IPTG-X-gal con un asa de Drigalski, secar en campana (5 min) e incubar (14 h, 37 °C).

- *Selección de colonias con plásmidos recombinantes:* sembrar una colonia blanca en otra placa de LB e incubar (9-10 h). Inocular un tubo de 50 ml con 30 ml de LB-Amp e incubar (100 rpm, 14 h, 37 °C). Monitorizar la DO₆₀₀ y retirar el cultivo para extraer los plásmidos cuando alcance 0,5.

2.6.10. Secuenciación de ADN y análisis de secuencias

La secuenciación de ADN fue realizada por *Secugen S. L.* (*spin-off* del CIB). Se utilizó un secuenciador automático con un sistema de electroforesis capilar (3730 *DNA Analyzer*, *Applied Biosystems*) y el *kit BigDye Terminator v3.1* que incluye los reactivos necesarios. Las muestras analizadas fueron ADN clonado en el vector *pGEM-T Easy* (1 µg/10 µl) o productos de PCR (0,2 µg/10 µl). Los *primers* utilizados (0,5 µM) con ambos tipos de muestras se indican en la **Tabla 2.28**.

Tabla 2.28. Primers utilizados para secuenciación de ADN.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Tipo de muestra
Promotor T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Plásmidos
M13 reverso	GGAAACAGCTATGACCATG	
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Productos de PCR
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Se utilizó el programa *Chromas LITE v2.01* para visualizar y exportar las secuencias. Para compararlas con las que están disponibles en las bases de datos se utilizaron las herramientas *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), *The Biology WorkBench* (<http://workbench.sdsc.edu>) y el servidor *Expasy* (<http://www.expasy.ch>).

2.7. IDENTIFICACIÓN DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

2.7.1. Identificación morfológica

La identificación morfológica se basó en el color de las colonias y de las hifas y en la presencia o ausencia de septos, fíbulas, conidios y formas de reproducción sexual. Los medios y las condiciones de cultivo se indican en los **Apartados 2.3.1** y **2.4.1**. Se utilizó un microscopio de óptica invertida *DMI6000B* (*Leica*) en el servicio de Microscopía Confocal y CCD del CIB. La adquisición de las imágenes se realizó con una cámara monocroma *Hamamatsu CCD C9100-02* de alta resolución.

También se estudió la velocidad de crecimiento en medios sólidos con diferentes azúcares como fuente de carbono (**Tabla 2.2**). Para ello, el hongo

aislado del CD se inoculó en el centro de las placas y se monitorizó el diámetro de las colonias fúngicas durante 8 días de incubación (3 réplicas).

2.7.2. Identificación molecular: secuenciación de los espaciadores transcribibles internos (*internal transcribed spacer*, ITS)

Los ITS1 e ITS2 son secuencias de ARN no funcionales situadas entre el ARN_r en el transcrito primario. Se utilizan rutinariamente para estudios de taxonomía y filogenia porque presentan una alta variabilidad intraespecífica y se encuentran repetidos en tándem (**Fig. 2.3**) (White *et al.*, 1990). Para amplificar estas regiones en el hongo aislado del CD, su ADN genómico sirvió de molde en una reacción de PCR preparada como se indica en el **Apartado 2.6.3**. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa (0,8%) y se purificó con el *kit* *GENECLEAN* para su secuenciación. En las reacciones de amplificación y de secuenciación se utilizaron los *primers* universales ITS1 e ITS4 (**Tabla 2.28**) que son específicos de zonas conservadas del ADN_r 18S y 28S, respectivamente.



Fig. 2.3. ADN_r de eucariotas. NTS, espaciador no transcribible; ETS, espaciador transcribible externo.

2.8. DEGRADACIÓN DE CD POR EL ANAMORFO DE *B. adusta*

2.8.1. Tipos de CD

En este estudio se han utilizado CD-A y CD-R comunes. Estos últimos presentaban la capa de colorante de tipo ftalocianina y su metal reflector era Ag (**Fig. 2.4A**). También se han empleado CD-A incompletos obtenidos en diferentes etapas de producción en una fábrica de Madrid: **i**) CD compuestos únicamente de la capa de policarbonato grabada (con *pits* y *lands*); **ii**) CD con la capa de Al y policarbonato; y **iii**) CD con la capa de laca, Al y policarbonato (**Fig. 2.4B**).

2.8.2. Colonización de CD

El objetivo de este experimento fue estudiar la colonización *in vitro* de CD-R comunes y también de CD-A obtenidos de todas las etapas del proceso de fabricación. Para ello, se prepararon cultivos del anamorfo de *B. adusta* en agar malta y se suplementaron con los diferentes tipos de CD tras 10 días de incubación. Éstos se esterilizaron previamente por inmersión en etanol al 70% (3

min) y se depositaron con la superficie del policarbonato grabada orientada hacia el micelio. Para acelerar el proceso de colonización, se realizó una hendidura en la etiqueta de los CD-R y CD-A completos, con ayuda de una cuchilla. Los CD-A incompletos se fragmentaron en 8 porciones del mismo tamaño para su utilización. La incubación se realizó en cámaras con 100% de humedad, a 28 °C. Paralelamente, se realizaron controles sin inocular. El progreso de la degradación se monitorizó semanalmente y se fotografió con una cámara digital (*Kodak DC290*).

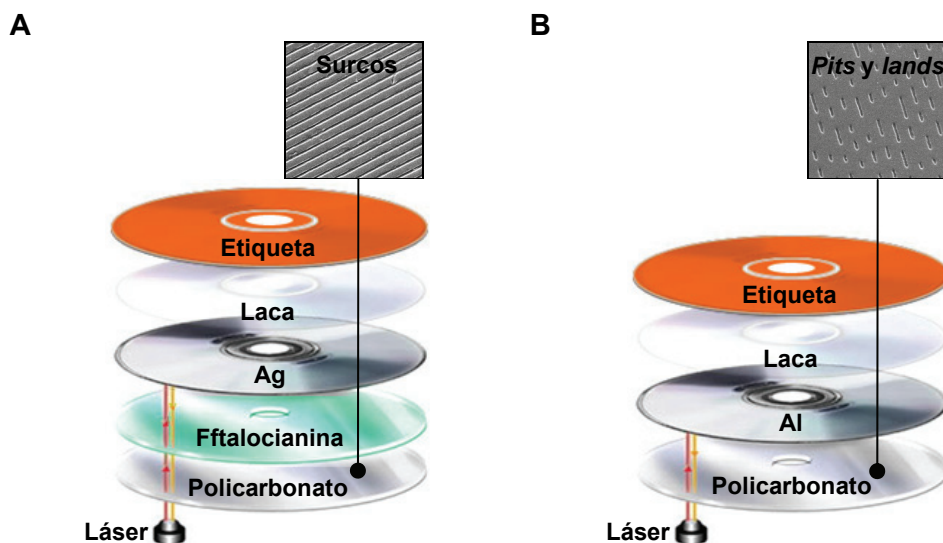


Fig. 2.4. Capas que constituyen los CD-R (A) y los CD-A (B). Se muestra un detalle de los surcos que guían al láser en los CD-R y de los *pits* y *lands* impresos en los CD-A para almacenar la información.

2.8.3. Degradación de diferentes componentes de los CD

2.8.3.1. Degradación de colorantes

La capacidad del hongo aislado para degradar colorantes de diversa estructura química (**Fig. 2.5**) se estudió en cultivo sólido. Para ello, se autoclavó (110 °C, 30 min) medio Kimura con $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 500 μM y 20 g/L de agar. A continuación, se enfrió a 50 °C para suplementarse con los colorantes (concentración final 50 mg/L) esterilizados por filtración (0,2 μm). Sobre la superficie del agar se depositó un fragmento (0,6 x 0,6 mm) de un preinóculo, con 9 días de incubación, preparado en el mismo medio sin colorante. Se monitorizó el diámetro del halo de degradación en torno al inóculo durante su

incubación a 28 °C (3 réplicas/colorante). Como controles se utilizaron placas con colorante sin inocular y placas sin colorante inoculadas.

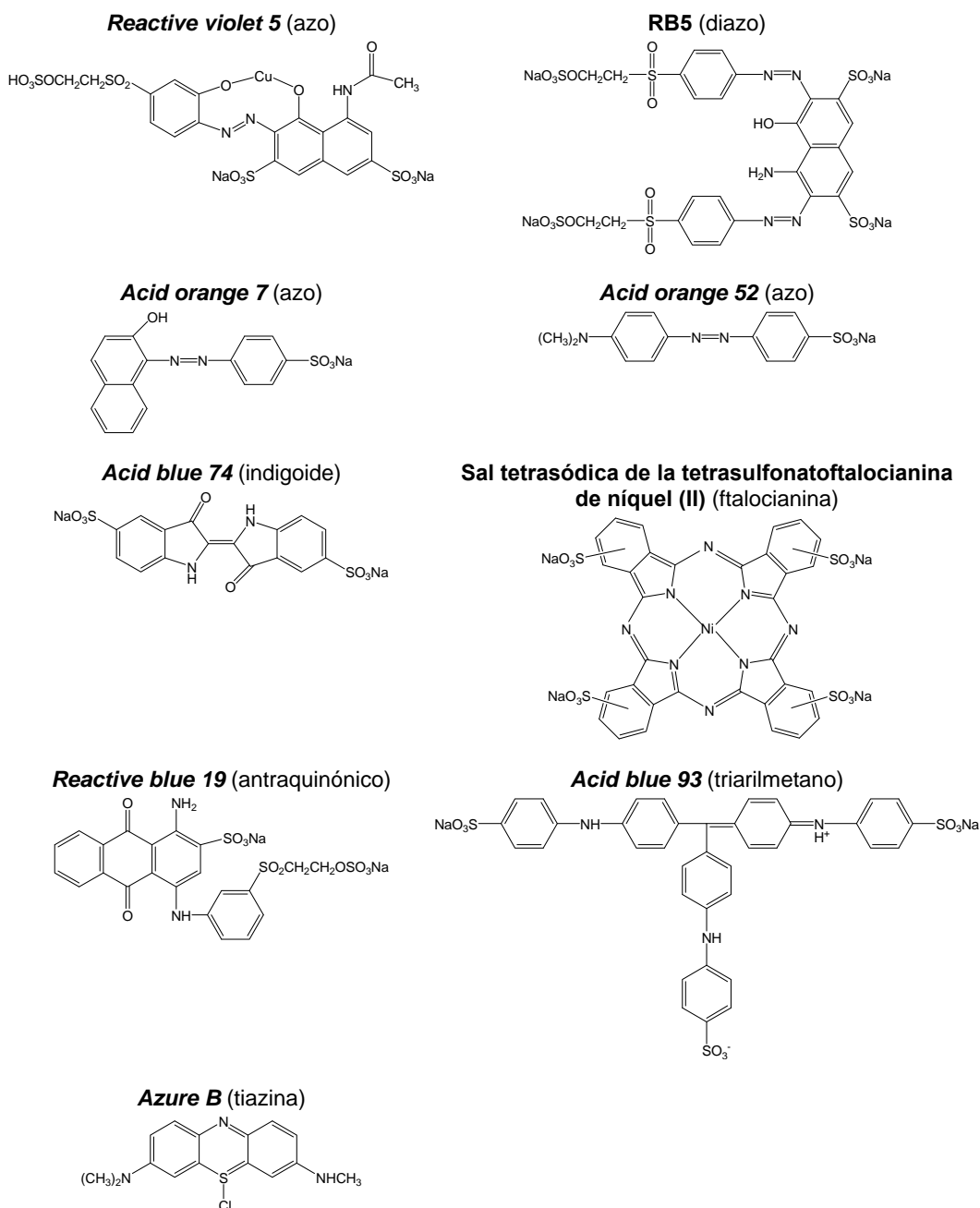


Fig. 2.5. Estructura química de colorantes agregados a cultivos del anamorfo de *B. adusta*.

2.8.3.2. Degradación de aluminio

Se estudió la degradación de la capa de Al de CD-A incubados en cultivos líquidos del anamorfo de *B. adusta* (50 ml medio/matraz, 150 rpm, 28 °C). Se utilizó el medio Czapek-Dox modificado y CD compuestos de policarbonato, Al y laca. Además, se incubaron CD sin la capa de laca, utilizando el mismo medio de cultivo y también el medio Kimura. En ambos casos, se agregaron 0,2 g de fragmentos de CD (~ 2,5 x 2,5 x 1 mm) obtenidos con una guillotina y autoclavados (110 °C, 30 min). Los cultivos fúngicos se suplementaron con los CD tras 5 y 10 días de incubación en medio Czapek-Dox y Kimura, respectivamente. A los 20 días de incubación en presencia de CD, se separó por decantación el líquido de cultivo y se recogieron los fragmentos de CD con unas pinzas de plástico. A continuación, se determinó la concentración de Al en los fragmentos, el micelio y el líquido. Además, en este último se analizó la presencia de ácidos orgánicos. Paralelamente se realizaron controles, en ausencia y presencia de CD y del hongo, a pH 5,5, 7,0 y 8,0. Los análisis mencionados se realizaron por triplicado según se describe en los siguientes apartados.

2.8.3.2.1. Cuantificación de aluminio por espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

Los análisis de ICP-OES se realizaron con un espectrómetro *Optima 4300 DV* (Perkin Elmer) en el Centro de Ciencias Medioambientales del CSIC, en Madrid. Para ello, se liofilizaron los fragmentos de CD, el líquido de cultivo y el micelio. A continuación, el micelio se hidrolizó con HCl 6 N (65-70 °C, 4 h), se incubó en un baño hirviendo hasta la evaporación del HCl y se disolvió en HNO₃ al 10% (v/v). El líquido de cultivo y los fragmentos de CD liofilizados se resuspendieron directamente en HNO₃ al 10%. Los tres tipos de muestras se incubaron 14 h a temperatura ambiente y a continuación se diluyó el HNO₃ al 1% con H₂O Milli-Q. Finalmente, se centrifugaron (12000 g, 10 min) y se filtraron (7-9 µm) para su análisis por ICP-OES. Esta técnica permite la ionización y excitación de los diferentes elementos químicos de una muestra en el interior de un plasma. Los iones de Al generados emiten a 396,153 nm, por lo que pueden ser cuantificados utilizando las correspondientes soluciones calibradoras (200 y 1000 µg/L).

2.8.3.2.2. Determinación de ácidos orgánicos por HPLC

Se analizó por HPLC el líquido de cultivo del anamorfo de *B. adusta* para detectar ácidos orgánicos que pudieran ser responsables de la solubilización de Al. Para estos análisis se utilizaron sólo los cultivos en medio Czapek-Dox modificado. Las muestras se obtuvieron tras 30 días de incubación. El equipo empleado (*LKB-VWM 2141*, Pharmacia) consta de un inyector, un detector de

luz UV-Vis, dos bombas y un horno de columnas para mantener la temperatura a 30 °C. Se utilizó la columna *Supelcogel C-610 H* (30 x 0,78 cm) que presenta una resina de intercambio catiónico de poliestireno divinilbenceno sulfonado. La fase móvil fue ácido fosfórico al 0,1% (flujo 0,5 ml/min, 25 min), el volumen de muestra fue 4 µl y la detección se realizó a 210 nm. En los cromatogramas obtenidos se comparó el tiempo de retención de los componentes de las muestras con el de diferentes patrones (ácido succínico, oxálico, tartárico, acético, cítrico y málico).

2.8.3.3. Degradación de policarbonato de BPA

Se investigó la capacidad del anamorfo de *B. adusta* de degradar policarbonato de BPA en medio Kimura (50 ml/matraz, 150 rpm, 28 °C). Para ello, se prepararon los medios de cultivo con 0,5 g de policarbonato, en forma de gránulo, polvo o lámina.

Los gránulos se obtuvieron de la empresa *Bayer (Makrolon DPI-1265)*, ~ 3 x 2 mm). Para obtener el polvo, se sumergieron los gránulos en tetrahidrofurano (14 h) y a continuación se recogió el precipitado tras centrifugación (12000 g, 15 min). Éste se sumergió en el mismo volumen de H₂O Milli-Q, se homogenizó con una varilla de vidrio y se centrifugó para retirar el sobrenadante (12000 g, 15 min). Este lavado con H₂O se repitió 4 veces más y finalmente se secó el precipitado en una estufa (60 °C).

El policarbonato en lámina, es el que se utiliza para fabricar los CD. En este estudio se utilizaron láminas grabadas, con *pits* y *lands*, en ausencia del resto de las capas que componen los CD-A. Además, otros cultivos se suplementaron con láminas de policarbonato recubiertas de Al y a otros se agregaron láminas con Al y laca. También se utilizaron CD-R y CD-A completos. Todos los tipos de CD fueron fragmentados con una guillotina (~ 2,5 x 2,5 x 1 mm).

En los siguientes apartados se indican los análisis realizados con cada forma de policarbonato.

2.8.3.3.1. *Análisis de microscopía óptica y electrónica*

Para los estudios de microscopía se utilizaron CD-R comerciales y CD-A obtenidos de todas las etapas de fabricación. Se analizaron fragmentos de CD tras 1 y 2 meses de incubación recogidos de los cultivos como se indica en la **Apartado 2.8.3.2**. Se compararon con muestras de controles sin inocular.

Las imágenes de SEM fueron obtenidas con detectores de electrones secundarios en el microscopio ambiental *FEI Quanta 200* del Museo Nacional de Ciencias Naturales del CSIC (Madrid). Se seleccionaron condiciones de alto vacío, un voltaje de aceleración de 25-27 kV y una distancia de 9,6-10,9 mm.

Para su visualización, las muestras fueron fijadas a un soporte de Al mediante cinta biadhesiva de carbono (*FEDELCO*), secadas al vacío (1 Torr) y recubiertas con Au utilizando una *sc510 sputter machine* (*Bio-Rad*) durante 1 minuto.

Algunas muestras también se examinaron en un microscopio de óptica invertida *DMI6000B* (*Leica*) en el servicio de Microscopía Confocal y CCD del CIB. La adquisición de las imágenes se realizó con una cámara monocroma *Hamamatsu CCD C9100-02* de alta resolución.

2.8.3.3.2. Análisis de HPLC

A los 30 días de incubación, se analizaron por HPLC los cultivos con policarbonato en forma de gránulos, polvo o fragmentos de CD-A en su primera etapa de fabricación (sólo con la capa de policarbonato grabada). Estos cultivos se filtraron al vacío, a través de papel de filtro y se recogió el líquido para analizarlo. El equipo de HPLC fue similar al descrito en el **Apartado 2.8.3.2.2** pero incluía un detector de diodos para registrar los espectros de absorción de los elementos de la muestra. Se dispuso de este equipo en el departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá de Henares (Madrid). La columna fue de fase reversa (*Purospher STAR RP-18*, *Merck*) y la muestra (300 µl) se eluyó con un gradiente lineal de acetonitrilo (45-60% en 20 min) y ácido fosfórico al 0,1% (flujo 1 ml/min). Como patrón se utilizó BPA.

2.9. PURIFICACIÓN DE LA AAO Y DE LAS MnP PRODUCIDAS POR EL ANAMORFO DE *B. adusta*

Se purificó una AAO y dos isoenzimas con actividad MnP de los cultivos del anamorfo de *B. adusta*. Esta especie fúngica secretó simultáneamente estas oxidorreductasas en el medio Kimura con 500 µM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (200 ml/matraz, 150 rpm, 28 °C). Tras 7 días de incubación, el líquido de cultivo (2-3 L) se separó del micelio filtrando al vacío a través de papel de filtro. Como se explica en los siguientes apartados, los criterios de purificación fueron la carga y la masa molecular de estas proteínas. Durante el proceso se utilizaron varios sistemas de concentración y diálisis.

2.9.1. Técnicas cromatográficas

La purificación de ambas oxidorreductasas incluyó tres pasos cromatográficos utilizando como fase móvil acetato sódico 10 mM. Las columnas se equilibraron previamente según las condiciones iniciales requeridas. A continuación se detallan las técnicas empleadas:

- *Cromatografía de intercambio aniónico*: las columnas presentan una matriz (fase estacionaria) con carga positiva. La carga de la proteína depende del pH de la fase móvil. Al pH utilizado, superior al punto isoelectrico de las enzimas de interés, éstas están cargadas negativamente y quedan retenidas en la matriz de la columna por atracción electrostática. Posteriormente, las proteínas retenidas se eluyen con un gradiente de NaCl. Se utilizaron columnas de este tipo, para los dos primeros pasos de purificación de las proteínas con actividad AAO y MnP.

En primer lugar, el líquido de cultivo concentrado se aplicó a un cartucho de intercambio aniónico de baja eficacia, denominado *HiTrap-Q FF* (5 ml, *GE Healthcare*). Varias de las proteínas retenidas a pH 5,5 (incluyendo la AAO y las MnP) eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 250 mM de NaCl, en 140 min. A continuación, se mantuvo la concentración 1 M de NaCl hasta que eluyeron el resto de las proteínas adheridas. Se utilizó el equipo *EconoSystem* (*Bio-Rad*) que incluye una bomba peristáltica, un conductivímetro, un detector de luz UV, un colector y un registrador. El volumen de muestra fue de 50-100 ml. Se recogieron fracciones de 2 ml para determinar la absorbancia, la concentración de proteínas y las actividades AAO y MnP.

Como segundo paso cromatográfico, se utilizó la columna *Mono-Q*. Ésta es también de intercambio aniónico pero de alta eficacia. Se inyectaron separadamente las muestras con actividad AAO y MnP recogidas tras la primera cromatografía de intercambio aniónico. Utilizando un gradiente de 50 a 100 mM de NaCl en 43 minutos, se separaron dos isoenzimas con actividad MnP. Para las muestras con AAO, el gradiente utilizado fue de 0 a 200 mM de NaCl en el mismo tiempo. Además, ambos gradientes incluyeron una fase final con NaCl 1 M para eluir las proteínas remanentes en la columna. Se utilizó un equipo *AKTAbasic* (*Amersham*) para cromatografía líquida de alta eficacia (*high performance liquid chromatography*, HPLC). Este equipo consta de un inyector, un detector de luz UV-Vis, un conductivímetro, dos bombas y un colector de fracciones. Se inyectaron 0,5-2 ml de muestra y el programa utilizado para analizar los cromatogramas obtenidos fue *Unicorn 5.11* (*Amersham*). Durante la elución, se monitorizó la absorbancia a 280 nm, que es característica de proteínas. Además, se valoró a 465 y 410 nm para detectar la AAO y las MnP, respectivamente. En las fracciones recogidas, se determinaron las actividades AAO y MnP y la concentración de proteína.

- *Cromatografía de exclusión molecular*: con esta técnica las proteínas se separan en base a su masa molecular. Así, las proteínas de mayor tamaño son las primeras que eluyen a través de las esferas porosas que constituyen la matriz de la columna. La fase móvil contiene NaCl (150 mM) para evitar las interacciones electrostáticas entre la muestra y la matriz. La columna utilizada, *Superdex-75*

HR 10/30 (Amersham), se conectó al HPLC descrito en el apartado anterior. El máximo volumen de muestra que admite esta columna es de 200 µl. Se utilizó como último paso de purificación de la AAO y de las dos isoenzimas con actividad MnP separadas en la cromatografía anterior. Como se detallará posteriormente (**Apartado 2.10.2**), esta técnica sirvió también para calcular la masa molecular y el estado de oligomerización de las proteínas nativas.

La siguiente tabla resume el proceso de purificación completo de la AAO y de las dos MnP.

Tabla 2.29. Etapas de purificación de la AAO y de las MnP.

Técnica	Columna	pH	Flujo (ml/min)	NaCl (mM)	t (min)
Intercambio aniónico	<i>HiTrap-Q</i>	5,5	1	0-250	140
	<i>Mono-Q</i>	5,0	0,8	AAO 0-200	43
				MnP 50-100	
Exclusión molecular	<i>Superdex-75</i>	5,0	0,4	150	50

La fase móvil fue acetato sódico 10 mM.

2.9.2. Concentración y diálisis por ultrafiltración

Los líquidos de cultivo y las muestras recogidas después de cada paso de purificación, se concentraron por ultrafiltración. Esta técnica también se utilizó para dializar las muestras antes de aplicarlas a las columnas de intercambio aniónico o de realizar la caracterización de las proteínas purificadas. Los equipos empleados se describen a continuación:

- *Equipo de ultrafiltración tangencial*: se utilizó un sistema que incluye una bomba peristáltica (7518-02, *Masterflex*) y una membrana con un corte molecular de 3 kDa (*Membrane Cassette, Filtron*). El líquido de cultivo del anamorfo de *B. adusta* (2-3 L) se concentró hasta obtener un volumen de 100 ml. A continuación, se diluyó con acetato sódico 10 mM pH 5,5 (hasta un volumen final de 5 L) y se concentró de nuevo. De este modo, se obtuvo una muestra dializada y con un volumen y un pH apropiados para realizar el primer paso cromatográfico de purificación.
- *Célula de ultrafiltración*: en la célula utilizada (volumen máximo 200 mL, *Amicon, Millipore*) se incorporó una membrana con un corte molecular de 3 kDa (*Millipore*) y se utilizó nitrógeno para ejercer presión, en agitación suave. Las muestras recogidas tras el primer paso cromatográfico se concentraron hasta 10-20 ml por este sistema y a continuación se dializaron con tampón acetato sódico 10 mM a pH 5,0. Para esto último, se diluyó la muestra 10 veces y se volvió a concentrar hasta el volumen requerido.

▪ *Dispositivos de ultrafiltración por centrifugación:* el sistema utilizado incluye una membrana vertical con un corte molecular de 3 kDa y sirve para reducir volúmenes máximos de 4 ml hasta 50 μ l (*Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices, Millipore*). La centrifugación se realizó a 7500 g, con objeto de concentrar las muestras para la cromatografía de exclusión molecular. Además, esta técnica se utilizó también para dializar las proteínas purificadas (diluyendo 10 veces con un tampón apropiado y volviendo a concentrar). Además, para concentrar muestras de 0,5 ml a 5 μ l, se utilizaron los *Nanosep Centrifugal Devices (Pall)* con membrana horizontal (3 kDa). Las muestras concentradas por este sistema a 14000 g, se analizaron mediante electroforesis e isoelectroenfoque.

2.10. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESPECTROSCÓPICA DE LA AAO Y DE LAS MnP DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

2.10.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Se realizaron electroforesis en geles verticales de poliacrilamida, preparados en condiciones desnaturalizantes con el detergente aniónico dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Se utilizó el método de Laemmli (1970) y el sistema *Mini Protean III Cell (Bio-Rad)*. Esta técnica permitió monitorizar el proceso de purificación de la AAO y de las MnP. Además, se utilizó para estimar las masas moleculares y el grado de glicosilación y de oligomerización de estas enzimas, según se describe en los siguientes apartados. Se utilizaron geles compuestos de 2 partes que solidificaban independientemente (**Tabla 2.30 y 2.31**). La parte inferior o gel separador, se preparó con acrilamida/bis al 7,5 y 12% (p/v) para la AAO y las MnP, respectivamente. Con la misma solución al 4%, se prepararon los correspondientes geles de concentración y se aplicaron en la parte superior. El potencial aplicado fue de 50 V hasta que las muestras atravesaron el gel de concentración y de 120 V durante el resto de la electroforesis. Se llevó a cabo a temperatura ambiente, utilizando los tampones que se describen en las **Tablas 2.32 y 2.33**.

Tabla 2.30. Gel concentrador para SDS-PAGE.

Componente	ml/L
Acrilamida/bis 29,2:0,8	135,0
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	255,6
SDS 10% (p/v)	10,2
Persulfato amónico 10% (p/v)	5,1
TEMED	1,0

Tabla 2.31. Gel separador para SDS-PAGE.

Componente	ml/L	
	7,5%	12%
Acrilamida/bis 29,2:0,8	251,1	401,8
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	251,1	
SDS 10%	10,0	
Persulfato amónico 10%	5,0	
TEMED	0,5	

Introducir entre dos cristales verticales (fijados mediante pinzas y soporte), completar con H₂O Milli-Q y dejar polimerizar. Retirar H₂O, añadir la solución del gel concentrador, colocar el peine y dejar solidificar.

Tabla 2.32. Tampón de carrera para SDS-PAGE 10x.

Componente	g/L
Glicina	144
Tris-base	30

Ajustar pH a 8,3-8,6 y agregar SDS (1g/L solución 1x). Se conserva a 4 °C y se puede reutilizar.

Tabla 2.33. Tampón de muestra para SDS-PAGE.

Componente	ml/L
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	126,3
Glicerol 85% (v/v)	105,3
SDS 10%	210,5
Azul de bromofenol 1% (p/v)	52,6

Mezclar 475 µl con 25 µl del agente reductor β-mercaptoetanol. Agregar 5 µl de esta mezcla a las muestras (volumen final de carga 15-20 µl) y hervir (5 min) para desnaturalizar.

Tras la electroforesis, las proteínas se visualizaron con el colorante azul brillante Coomassie R-250. Esta técnica tiene un límite de detección de 1µg y consiste en:

- *Tinción*: sumergir el gel durante 1 h en una solución acuosa de azul brillante Coomassie R-250 0,1% (p/v), metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v).
- *Lavado*: retirar el exceso de colorante, en agitación suave, con una solución acuosa compuesta de metanol (27%) y ácido acético (9%).

En algunos casos se realizó una tinción con Ag, que es un método más sensible. Éste permite detectar incluso 5-10 ng de proteína y su protocolo consiste en (Switzer, III *et al.*, 1979):

- *Fijación*: incubar en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 5% (30 min).
- *Lavado*: cubrir con metanol al 50% (15 min) y después con H₂O Milli-Q (15 min).
- *Sensibilización*: sumergir en tiosulfato sódico al 0,01% (p/v, 1 min).
- *Lavado*: 2 lavados con H₂O Milli-Q (1 min/lavado).
- *Tinción*: incubar en nitrato de plata al 0,1% (p/v, 20 min, 4 °C).
- *Lavado*: 2 lavados con H₂O Milli-Q (1 min/lavado).
- *Revelado*: sumergir en carbonato sódico al 2% (p/v) en formalina al 0,04% (v/v) hasta la visualización de las proteínas.
- *Fijación*: incubar en una solución de ácido acético al 5% (5 min).

2.10.2. Determinación de la masa molecular

Las 3 técnicas que se describen a continuación permiten obtener la masa molecular con diferente grado de precisión.

- *Electroforesis en condiciones desnaturalizantes*: se realizaron SDS-PAGE según se describe en el apartado anterior. Esta técnica permitió estimar la masa molecular aproximada de la AAO y de las MnP por interpolación en una recta de calibrado con estándares de 6,5-200 kDa (AAO: $\text{Log}M = -0,9235R_f + 2,0388$, MnP: $\text{Log}M = -1,6359R_f + 2,1660$, R_f , distancia migrada por proteína/distancia migrada por colorante, $R^2 = 0,965$ y $1,0$, respectivamente).
- *Cromatografía de exclusión molecular*: la columna utilizada como último paso cromatográfico, en la purificación de la AAO y de las MnP (*Superdex-75*; **Apartado 2.9.1**), sirvió también para determinar sus masas moleculares y la naturaleza (monomérica o polimérica) de la forma activa de estas enzimas. Para esto último, se comparó la masa molecular determinada con esta técnica y con SDS-PAGE. El *Low molecular weight gel filtration calibration kit* (11,9-73,5 kDa) se usó para obtener la recta de calibrado ($M = -7,1127 \cdot t + 239,96$, t , tiempo de elución, $R^2 = 0,949$).
- *Espectrometría de masas*: la masa molecular, con mayor grado de precisión, fue determinada con un *Autoflex III MALDI-TOF/TOF instrument* (Bruker) en el servicio de Proteómica del CIB. Para ello, se mezcló la proteína (1 µg/µl H₂O Milli-Q) con la matriz (1:1, v/v) y se depositó 1 µl en una placa *MALDI MTP*

384 polished steel (Bruker). La matriz fue ácido sinápico y 2,5-dihidroxiacetofenona para la AAO y las MnP, respectivamente. *Protein calibration standard II* fue usado para calibración externa.

2.10.3. Grado de glicosilación

La AAO y las MnP purificadas fueron desglicosiladas con Endo H. Esta glicosidasa actúa en oligosacáridos ricos en manosa hidrolizando el enlace β -(1-4) de la *N,N'*-diacetilquitobiosa. Este dímero de *N*-acetilglucosamina es el que media la unión entre el oligosacárido y una Asn de la proteína (enlace *N*-glicosídico) (Tarentino y Maley, 1974).

Se incubaron 3 mU de Endo H por cada μg de proteína en tampón fosfato sódico 10 mM pH 6,0 (14 h, 37 °C, volumen final 50 μl). Para determinar el grado de glicosilación, se comparó la movilidad electroforética (SDS-PAGE o isoelectroenfoque) de las proteínas desglicosiladas (2-5 μg) con la de muestras no tratadas con Endo H.

2.10.4. Punto isoelectrico

Se determinó el pI de la AAO y de las MnP en geles horizontales de poliacrilamida preparados como se indica en la **Tabla 2.34** (11 x 6,5 x 0,04 cm, 7,4 mL). Se utilizó una cubeta modelo 1405 con refrigeración líquida (Bio-Rad) y se generó un campo eléctrico de 1000 V, 5 mA y 5 W (3 h). Las soluciones del ánodo y del cátodo fueron H_3PO_4 1 M y NaOH 1 M, respectivamente. Estas soluciones se aplicaron a tiras de papel *Whatman* n° 3 (~ 0,8 x 6,5 cm) colocadas en contacto con electrodos de platino. Este tipo de papel (fragmentos de ~ 7 x 2 mm) también se utilizó como soporte para las muestras (proteínas purificadas, 4-8 μg en 1-5 μl). Tras realizar el isoelectroenfoque, se midió el gradiente lineal de pH formado en el gel con un electrodo para superficies. El pI de las proteínas se determinó tras el revelado, por interpolación en la correspondiente recta de calibrado (AAO: $\text{pH} = 0,4111 \cdot d + 2,8139$, MnP: $\text{pH} = 0,3893 \cdot d + 2,7393$, d , distancia migrada por la proteína, $R^2 = 0,989$ y 0,993, respectivamente). El protocolo de revelado consistió en:

- *Lavado*: lavar el gel en una solución con metanol al 27% y ácido acético al 9% (1 min), para evitar interferencias con los anfolitos.
- *Tinción*: sumergir el gel en una solución con azul brillante Coomassie R-250 al 0,005%, metanol al 28% y ácido acético al 9%.

También se realizaron isoelectroenfocos de la AAO, que se revelaron con una solución que incluye alcohol veratrílico como sustrato (Martínez *et al.*,

1994). El método se basa en la oxidación por el H_2O_2 de I^- a I_2 y a partir de estos dos iones se forma I_3^- (con exceso de I^- que desplaza el equilibrio). El I_3^- forma un complejo con el almidón azul oscuro o negro, o marrón si se utilizan altas concentraciones de IK como en este caso. A continuación, se detalla el protocolo realizado utilizando 5-30 mU de AAO:

- *Modificación del pH del gel:* sumergir el gel en tampón fosfato sódico 200 mM pH 5,5 (5 min).
- *Tinción:* retirar el tampón y cubrir la superficie del gel con alcohol veratrílico 20 mM preparado en fosfato sódico 200 mM pH 5,5 (1 ml). Agregar una solución (1 ml) con NaOH 10 mM, almidón al 2% (p/v) y IK al 50% (p/v), en H_2O Milli-Q (el NaOH evita autooxidación del IK por lo que es importante preparar esta solución en el orden que se indica).
- *Conservación:* retirar el líquido cuando se empiecen a visualizar las bandas para evitar su difusión (~ 5 min). En oscuridad a 4 °C se prolonga su durabilidad pero no son muy estables.

Tabla 2.34. Gel de isoelectroenfoque.

Componente	pH	ml/L
Acrilamida/bis 29,2:0,8		251,6
Anfolitos	2,5-5,0	AAO 36,3
		MnP 40,4
	3,0-10	AAO 40,4
		MnP 36,3
Persulfato amónico 10%		5,0
TEMED		0,5

Aplicar la solución por capilaridad entre el soporte de polimerización y la superficie hidrófila del plástico *GelBond* (GE Healthcare). Sobre plástico fijar previamente un cristal del mismo tamaño con gotas de H_2O Milli-Q.

2.10.5. Determinación de la secuencia aminoacídica del N-terminal

La secuencia aminoacídica del extremo N-terminal de la AAO y de las MnP (100 pmoles) fue determinada por degradación de Edman. Se utilizó el secuenciador *Procise 494* (Perkin Elmer), con el detector de feniltiohidantoina 785A (*Applied Biosystems*), del servicio de Química de Proteínas del CIB.

2.10.6. Análisis espectroscópico

Estos ensayos se realizaron con un espectrofotómetro de dispositivo de fotodiodos *Hewlett-Packard 8453* a 24 °C, en cubetas de cuarzo (*Hellma*) de 100 μl y 1 cm de paso óptico (si no se indica lo contrario). La concentración de

enzima se calculó a partir de los correspondientes coeficientes de extinción molar determinados como se indica en el **Apartado 2.5.4**.

2.10.6.1. Espectro de absorción de la AAO y de las MnP

Los espectros de absorción UV-Vis de la AAO y de las MnP purificadas se obtuvieron en tampón (10 mM) fosfato sódico pH 6,0 y tartrato pH 5,0, respectivamente. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 ml.

2.10.6.2. Reducción anaeróbica de la AAO con alcoholes bencílicos

El estado redox de la AAO fue monitorizado espectrofotométricamente a varias concentraciones de sustrato en anaerobiosis. Alícuotas (1-4 μ l) de alcohol *p*-anisílico 0,7 mM, o de alcohol vainillílico 0,6 mM, fueron añadidas secuencialmente a una solución de AAO (22 μ M) en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0. Para asegurar condiciones anaerobias, todas las soluciones fueron previamente burbujeadas con argón (1 h) en presencia de 1 U de glucosa oxidasa y glucosa 310 mM. Únicamente la solución con la AAO se burbujeó en hielo. Se utilizaron cubetas selladas con tapones de goma (*Suba-Seal 13, Aldrich*) y el sustrato fue añadido con una microjeringa (10 μ l, *Hamilton*).

2.10.6.3. Reducción anaeróbica de la AAO con ditionito sódico

En este ensayo, se utilizó como agente reductor de la AAO una solución de ditionito sódico 250 mM en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0. Se agregaron diferentes volúmenes (6-11 μ l) a la enzima oxidada (22 μ M) para monitorizar su reducción secuencial por la variación de su espectro de absorción. Las condiciones anaeróbicas se obtuvieron como se describe en el apartado anterior.

2.10.6.4. Reactividad de la AAO con sulfito sódico

Se examinó la capacidad del FAD de la AAO de formar un aducto con el ión sulfito. Para ello se tituló la AAO (22 μ M) con diferentes volúmenes de una solución de sulfito sódico 1 M (0,2-0,4 μ l) y 2 M (1-200 μ l) en fosfato sódico 100 mM pH 6,0. Simultáneamente se monitorizó el espectro de absorción de la enzima.

2.11. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA AAO DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

Si no se indica lo contrario, todos los ensayos e incubaciones que se describen a continuación se realizaron a 24 °C, en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-160A* y cubetas de cuarzo de 1 ml. Los compuestos químicos utilizados, fueron

obtenidos de diversas casas comerciales (**Tabla 2.1**), a excepción del alcohol 3-cloro-*p*-anisílico que fue sintetizado, en el Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (CSIC, Zaragoza), por reducción con borano en tetrahidrofurano del correspondiente ácido (Yoon *et al.*, 1973). Todos los datos experimentales obtenidos en los estudios cinéticos, fueron ajustados a las correspondientes ecuaciones mediante el programa *SigmaPlot 11*.

2.11.1. Oxidación de alcoholes

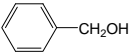
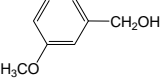
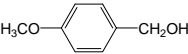
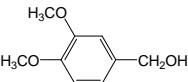
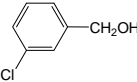
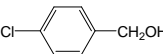
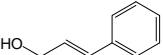
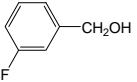
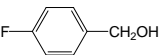
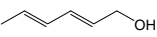
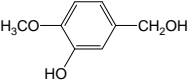
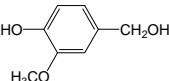
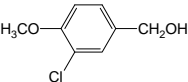
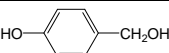
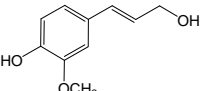
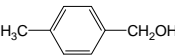
2.11.1.1. Constantes cinéticas de estado estacionario

Se calcularon las constantes cinéticas de estado estacionario de la AAO con todos los alcoholes (fenólicos y no fenólicos) que se incluyen en la **Tabla 2.35**. La actividad AAO sobre estos compuestos se determinó valorando la producción de aldehído (ensayos directos) y de H₂O₂ (ensayos acoplados), en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0. Se utilizaron concentraciones crecientes de los alcoholes, hasta saturación de la enzima, en ausencia y presencia de una concentración constante de HRP y de *o*-dianisidina (**Apartado 2.5.5**). La **Tabla 2.35** incluye la longitud de onda y los coeficientes de extinción molar utilizados para los ensayos directos. Los valores de velocidad inicial (v , s⁻¹) obtenidos a cada concentración de sustrato (S) se ajustaron a las **Ecuaciones 2.2** y **2.3** que describen una función hiperbólica. De este modo, se calcularon las medias y los errores estándar de la constante de Michaelis-Menten (K_m), la constante catalítica (k_{cat}) y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m). La concentración de AAO se determinó utilizando su ϵ_{463} , calculado según se describe en el **Apartado 2.5.4.3**.

$$v = \frac{k_{cat}S}{K_m + S} \quad (2.2)$$

$$v = \frac{(k_{cat} / K_m)S}{1 + (k_{cat} / K_m)S / k_{cat}} \quad (2.3)$$

Tabla 2.35. Alcoholes testados como sustratos de la AAO.

Alcohol		λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ ·cm ⁻¹)	Referencia
Bencílico		250	13800	(Guillén <i>et al.</i> , 1992)
<i>m</i> -Anisílico		314	2540	
<i>p</i> -Anisílico		285	16950	
Veratrílico		310	9300	
<i>m</i> -Clorobencílico		240	5923	(Ferreira <i>et al.</i> , 2005)
<i>p</i> -Clorobencílico		260	15862	
Cinamílico		310	15600	
<i>m</i> -Fluorobencílico		246	10280	
<i>p</i> -Fluorobencílico		252	13700	
2,4-Hexadien-1-ol		280	30140	
Isovainillílico		307	7383	
Vainillílico		309	8332	
3-Cloro- <i>p</i> -anisílico		295	15000	(de Jong <i>et al.</i> , 1994a)
<i>p</i> -Hidroxibencílico		300	8880	(Farmer <i>et al.</i> , 1960)
Coniferílico		338	24222	(Romero <i>et al.</i> , 2009)
<i>p</i> -Metilbencílico		261	15104	

2.11.1.2. Correlaciones cuantitativas entre la estructura de los sustratos y las constantes cinéticas

Se realizaron análisis de relación cuantitativa estructura-actividad (*quantitative structure-activity relationship*, QSAR) con la AAO del anamorfo de *B. adusta*. Para estos estudios se utilizaron como sustratos los alcoholes bencílicos monosustituídos que se indican en el apartado anterior. El objetivo de estos análisis fue correlacionar cuantitativamente la estructura química de los sustratos con las constantes cinéticas de estado estacionario. Concretamente, se estudió la contribución de las propiedades electrónicas, estéricas e hidrofóbicas de los sustituyentes, en los valores de las constantes cinéticas obtenidas por producción de aldehído en tampón fosfato sódico 100 mM, a pH 6,0. Para ello, se realizaron análisis de regresión lineal simple y múltiple utilizando la **Ecuación 2.4**. En esta, σ (σ_p^+ , σ_p^-) es la constante electrónica de Hammett, π es la constante de hidrofobicidad, E_s es la constante estérica de Taft y MR es la refractividad molar. Los valores de estos parámetros fisicoquímicos para cada sustituyente, fueron obtenidos de Hansch y Leo (1979) y se incluyen en la **Tabla 2.36**. Los coeficientes ρ , a y b representan la contribución de cada variable independiente a la variable dependiente considerada.

$$\log k_{cat}, K_m, k_{cat} / K_m = \rho\sigma + a\pi + bE_s, MR + c \quad (2.4)$$

Tabla 2.36. Valores de diferentes parámetros fisicoquímicos para varios sustituyentes.

Sustituyente	σ_p^+	σ_p^-	F	π	E_s	MR
-H	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	1,03
-OCH ₃	-0,78	-0,26	0,29	-0,02	-0,55	7,87
-CH ₃	-0,31	-0,17	-0,04	0,56	-1,24	5,65
-Cl	0,11	0,19	0,42	0,71	-0,97	6,03
-F	-0,07	-0,03	0,45	0,14	-0,46	0,92
-OH	-0,92	-0,37	0,33	-0,67	-0,55	2,85

2.11.1.3. Influencia del pH y la temperatura en la actividad y la estabilidad

- *pH óptimo*: se determinó el pH óptimo de la AAO para oxidar alcohol veratrílico 10 mM y vainillílico 1,5 mM. Para ello, se valoró la producción de los correspondientes aldehídos y se calculó la actividad relativa (con respecto a la máxima actividad obtenida al pH óptimo). Se utilizó tampón citrato-fosfato-borato 100 mM (pH 2,0-9,0).
- *Efecto del pH en los valores de K_m , k_{cat} y k_{cat}/K_m* : el efecto del pH en las constantes cinéticas de la AAO, se determinó utilizando los alcoholes *p*-anisílico

y vainillílico como sustratos. El tampón empleado (100 mM) fue citrato fosfato a pH 2,5-5,0, fosfato sódico a pH 6,0-8,0 y pirofosfato sódico a pH 8,5. Se monitorizó la formación de los correspondientes aldehídos según se indica en el **Apartado 2.5.5.1**. Los valores de K_m , k_{cat} y k_{cat}/K_m en función del pH, se analizaron con las **Ecuaciones 2.5** y **2.6**. La primera ecuación describe una curva compuesta de segmentos lineales de pendiente +1, 0 y -1, mientras que la otra corresponde a una curva con sólo dos segmentos, de pendiente 0 y -1. K_1 y K_2 son las constantes de disociación para la ionización de los grupos de la proteína que deben estar desprotonados y protonados para la catálisis, respectivamente. C es el valor del parámetro cinético de interés que es independiente del pH y H es la concentración de H^+ . Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), para determinar a cuál de las dos ecuaciones se ajustan mejor los datos experimentales obtenidos.

$$\log Y = \log \frac{C}{1 + H / K_1 + K_2 / H} \quad (2.5)$$

$$\log Y = \log \frac{C}{1 + K_2 / H} \quad (2.6)$$

- *Estabilidad al pH*: se prepararon varias soluciones de la AAO purificada con distintos valores de pH. El tampón utilizado fue citrato-fosfato-borato 100 mM (pH 2,0-9,0). Se recogieron varias alícuotas de estas soluciones durante 24 h para valorar la actividad residual con alcohol veratrílico en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0 (**Apartado 2.5.5.1**).
- *Temperatura óptima*: se determinó la temperatura óptima de la AAO purificada para oxidar alcohol veratrílico 10 mM en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0 (**Apartado 2.5.5.1**). Se realizó en un espectrofotómetro *Cary 4000 UV-Vis* equipado con una unidad Peltier para controlar la temperatura (4-55 °C).
- *Estabilidad a la temperatura*: para estudiar la termoestabilidad de la AAO, se incubó durante 24 h a diferentes temperaturas (25-50 °C) en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0 con un *ThermoShaker TS-100* (Biosan). Alícuotas obtenidas de estas soluciones se utilizaron para determinar la actividad residual con alcohol veratrílico 10 mM en el mismo tampón (**Apartado 2.5.5.1**).

2.11.1.4. Mecanismo cinético: secuencial o ping-pong

Las reacciones catalizadas por la AAO requieren dos sustratos (orgánico y O_2) y generan dos productos (reacciones *bi bi*). Este mecanismo cinético puede ser

secuencial o *ping-pong*, si se ajusta a la **Ecuación 2.7** o a la **2.8**, respectivamente (Copeland, 2000). En estas funciones, A representa la concentración de sustrato orgánico, B la concentración de O_2 , K^A es la constante de disociación de A y K_m^A y K_m^B son las constantes de Michaelis de A y B , respectivamente.

$$v = \frac{k_{cat}AB}{K_m^B A + K_m^A B + AB + K^A K_m^B} \quad (2.7)$$

$$v = \frac{k_{cat}AB}{K_m^B A + K_m^A B + AB} \quad (2.8)$$

Para discernir entre estos dos tipos de mecanismos con la AAO, se utilizaron como sustratos reductores el alcohol *p*-anisílico, *m*-clorobencílico, *m*-fluorobencílico y vainillílico. Las reacciones se prepararon en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0. Se utilizaron concentraciones crecientes de estos alcoholes (hasta saturación de la AAO) y se calcularon las velocidades iniciales por producción de aldehído (**Apartado 2.5.5.1**), manteniendo constante la concentración de O_2 . Estos ensayos se realizaron a diferentes concentraciones de O_2 (0,052, 0,13, 0,273, 0,572 y 1,3 mM) y los datos obtenidos se ajustaron a la correspondiente ecuación (**2.7** ó **2.8**).

Para estos ensayos, la mezcla de reacción (volumen final 1 ml) se preparó en cubetas de cuarzo con tapón de rosca perforado (*Hellma*) y septos de silicona-politetrafluoretileno (12 x 2 mm, *Chromacol*). Se burbujearon las distintas mezclas de O_2/N_2 (10 min), a través de estos septos, con una aguja (*Kel-F hub style 2, Hamilton*) sumergida en el sustrato disuelto en el tampón. El septo se perfora además con otra aguja que permite la salida de gases al exterior (no sumergida). Entre la botella de gas y dos válvulas contiguas (*Minature two-way inlet valve, Hamilton*), conectadas a 3 cubetas, se sitúa un frasco lavador de gases de tipo Drechsel con 50 ml de H_2O destilada (250 ml, *Vidra FOC*). La reacción se inició al agregar 2 μ l de AAO mediante una microjeringa (*Hamilton*) y se monitorizó con un espectrofotómetro *Cary 4000 UV-Vis*.

2.11.2. Oxidación de aldehídos aromáticos

Se testaron como sustratos de la AAO varios aldehídos aromáticos: el *p*-anisalaldehído, el 3-cloro-*p*-anisalaldehído, el *m*-clorobenzaldehído, el *trans*-cinamalaldehído, el *m*-fluorobenzaldehído, el *p*-nitrobenzalaldehído y la vainillina. En primer lugar, se monitorizaron las variaciones de sus espectros de absorción en presencia de 0,5 μ M de AAO con un espectrofotómetro de dispositivo de

fotodiodos *Hewlett–Packard 8453*. Para estos ensayos la concentración final de los aldehídos en la mezcla de reacción fue de 0,1 mM, a excepción del *m*-clorobenzaldehído y el *m*-fluorobenzaldehído que se utilizaron a 0,3 y 0,2 mM, respectivamente. Estas reacciones se prepararon en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0.

A continuación, se valoró la actividad a distintas concentraciones de los aldehídos (hasta saturación de la AAO) mediante ensayos acoplados con la HRP y *Amplex Red* como se indica en el **Apartado 2.5.5.2**. Los datos obtenidos se utilizaron para calcular las constantes cinéticas de estado estacionario aplicando las **Ecuaciones 2.2 y 2.3**.

2.11.3. Reacciones de desmetilación, hidroxilación y desaminación

Se estudió la capacidad de la AAO para catalizar reacciones de desmetilación, hidroxilación y desaminación en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0 y 7,5. Para ello se utilizó bencilmetil éter 9 mM, *p*-(metoximetil)fenol 1,5 mM, eugenol 1 mM y *p*-metoxibencilamina 1,5 mM (**Fig. 2.6**). Estos compuestos se mezclaron con la AAO (0,5 μ M) y se monitarizaron las variaciones en sus espectros de absorción, a distintos tiempos de incubación, utilizando un espectrofotómetro de dispositivo de fotodiodos *Hewlett-Packard 8453*.

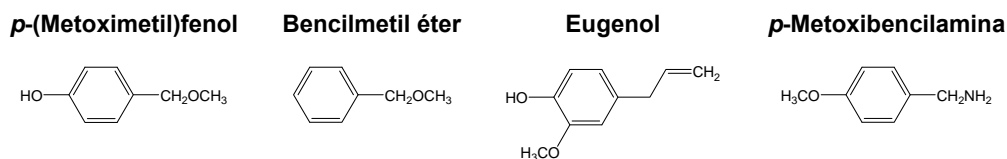


Fig. 2.6. Estructura química de los compuestos utilizados para estudiar reacciones de desmetilación, hidroxilación y desaminación.

2.11.4. Estudios de inhibición

Se realizaron reacciones de inhibición de la oxidación de alcohol veratrílico por la AAO. Los inhibidores testados, en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0, fueron eugenol (2 y 6 μ M), bencilmetil éter (83 y 166 μ M), *p*-(metoximetil)fenol (300 y 900 μ M), *p*-metoxibencilamina (4 y 8 mM) y metanol (1 y 2 M). Además, se utilizó el mismo tampón a pH 8,0 en el caso de la amina (3 y 4 mM).

Para estos ensayos, se valoró la actividad AAO (a 310 nm) con concentraciones crecientes de alcohol veratrílico, hasta saturación de la enzima, en presencia de una concentración constante de inhibidor. Se ajustaron las velocidades iniciales (s^{-1}), a cada concentración de inhibidor (*I*), mediante la **Ecuación 2.9 ó 2.10** (inhibición competitiva y no competitiva, respectivamente) para obtener las medias y los errores estándar de la constante de inhibición (K_i).

$$v = \frac{k_{cat}S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S} \quad (2.9)$$

$$v = \frac{k_{cat}S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad (2.10)$$

2.12. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LAS MnP DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

Para determinar a qué tipo de peroxidasa ligninolítica (MnP, LiP, o VP) correspondían las peroxidasas purificadas, se testaron como sustratos el MnSO₄, el alcohol veratrílico y el RB5, según se indica en el **Apartado 2.5.5.1**. También se valoró la actividad sobre DMP ($\epsilon_{469} = 27500$) y ABTS en tartrato 100 mM a pH 3,0 y 3,5, respectivamente (Martínez *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 1997). En todos los casos se agregó H₂O₂ 0,1 mM a la mezcla de reacción. A continuación, se determinaron los parámetros cinéticos con concentraciones crecientes de los compuestos oxidados por la enzima (MnSO₄, DMP y ABTS), utilizando las condiciones mencionadas para cada sustrato. Se valoró el producto de oxidación liberado durante 1 minuto a la correspondiente longitud de onda. La velocidad inicial (s⁻¹) se calculó utilizando incrementos lineales de absorbancia y la concentración de MnP determinada a partir de su ϵ_{408} . Los datos obtenidos se ajustaron a las **Ecuaciones 2.2 y 2.3**.

2.13. CLONACIÓN DE LA AAO DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

Para obtener la secuencia completa del gen que codifica la AAO, se llevaron a cabo varias estrategias que se describen a continuación.

2.13.1. Obtención de la secuencia nucleotídica del extremo N-terminal

El extremo 5' del gen de la AAO se amplificó por PCR utilizando ADN genómico (0,46 µg) y *primers* degenerados (**Tabla 2.37**), basados en ambos extremos de la secuencia aminoacídica del N-terminal (obtenida por degradación de Edman, **Apartado 2.10.5**). Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa (2%) y se purificó la banda, con la masa molecular esperada, mediante el *kit* GENE CLEAN. Se ligó en el vector *pGEM-T Easy* y se transformó *E. coli* DH5α. La extracción del plásmido recombinante se realizó con el *kit*

NucleoSpin plasmid. Finalmente, se cuantificó en un gel de agarosa para su secuenciación.

Tabla 2.37. Primers para amplificar el extremo 5' del gen AAO.

Nombre	Secuencia 5'→3'	μM	T _h (°C)
D1	GCNACNTTYTTYACNGAYGC	4	55
D2	DATRAARTCRTANACNGTNG		

N = A, C, G o T; Y = C o T; D = G, A o T; R = A o G.

2.13.2. Genome walking mediante single-specific-primer PCR (SSP-PCR)

La SSP-PCR es una modificación de la PCR convencional que permite la amplificación de fragmentos de un gen de secuencia desconocida que se encuentren flanqueados, únicamente en uno de sus extremos, por una región de secuencia conocida (Shyamala y Ames, 1989). Consiste en que fragmentos de restricción de ADN genómico se insertan en un vector y la amplificación de la secuencia de interés se lleva a cabo con un *primer* específico de la región conocida y otro que hibrida en el vector. A continuación se indica el procedimiento realizado para obtener gran parte de la secuencia que codifica la AAO:

- *Digestión de ADN genómico y obtención de fragmentos romos*: diseñar un *primer* con la secuencia del extremo 3' del N-terminal del gen de la AAO (SP1) y localizar dianas de restricción anteriores al *primer* (**Fig. 2.7**). Digerir el ADN genómico y purificar los fragmentos de restricción con el *kit* GENE CLEAN. Si se utilizan endonucleasas que generan extremos cohesivos, obtener extremos romos con la T4 ADN polimerasa y purificar de nuevo los fragmentos.
- *Insertión en el vector y amplificación*: incorporar una A en ambos extremos 3' con la Taq ADN polimerasa para ligar en el vector *pGEM-T Easy* (**Apartado 2.6.6**). Amplificar por PCR utilizando el *primer* SP1 y otro que hibride en el vector (V1) (**Fig. 2.7**). Separar en gel de agarosa los productos de PCR, cortar bandas y purificarlas.

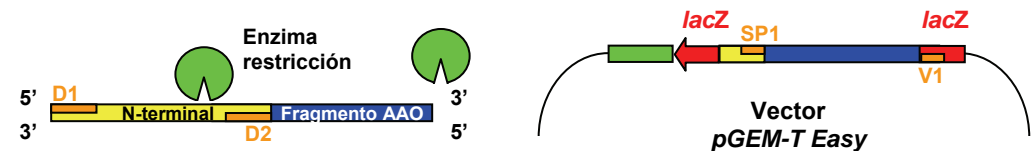


Fig. 2.7. Inserción en el vector *pGEM-T Easy* de los fragmentos de restricción. Se muestra la localización de los *primers* utilizados para obtener el N-terminal (**Apartado 2.13.1**) y el primer fragmento de la AAO por SSP-PCR.

- *Secuenciación*: ligar en el vector el producto de amplificación, transformar *E. coli* DH5α y extraer los plásmidos recombinantes con el *kit NucleoSpin plasmid*. Cuantificar en un gel de agarosa y secuenciar.
- *Diseño de nuevos primers y elección de enzimas de restricción*: diseñar un *primer* específico con la secuencia del extremo 3' del nuevo fragmento obtenido (SP2). Localizar dianas de restricción anteriores a la secuencia del *primer* y repetir el proceso (**Fig. 2.8**). La **Tabla 2.38** contiene la secuencia de todos los *primers* específicos utilizados para esta técnica y la del *primer* V1.

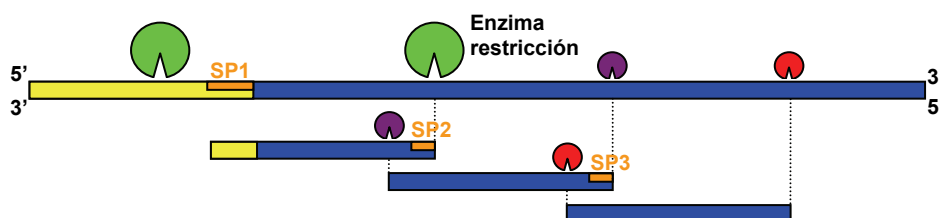


Fig. 2.8. Genome walking: obtención del gen AAO solapando fragmentos obtenidos por SSP-PCR.

Tabla 2.38. Primers para amplificar fragmentos del gen AAO por SSP-PCR.

Nombre	Secuencia 5'→3'	μM	T _h (°C)
SP1	CCACCGTTTACGACTTCATC	2	55
SP2	CCCCATCCCATACGCTAAG	1	55
SP3	CAGGATGGACACAACACTAC	0,6	52
V1	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC		

V1 a la misma concentración que el correspondiente *primer* SP.

2.13.3. PCR con *primers* basados en secuencias conservadas

Se realizó una PCR con ADN genómico (119 ng) para obtener el siguiente fragmento de la AAO. La mezcla de reacción incluía un *primer* con la secuencia de la AAO (SP2, **Tabla 2.38**) y otro degenerado basado en un motivo conservado en la familia GMC de oxidorreductasas que es adyacente al extremo C-terminal (D3, **Tabla 2.39**).

Tabla 2.39. Primer basado en un motivo conservado de las proteínas de la familia GMC de oxidorreductasas.

Nombre	Secuencia 5'→3'	μM	T _h (°C)
D3	GANNCTCNACNANNCNNANCC	2,4	49

N = A, C, G o T.

2.13.4. Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

La técnica RACE se utilizó para obtener la secuencia del extremo 3' del gen de la AAO a partir de su ARN_m. Se utilizó el método descrito por Frohman *et al.* (1988) que se detalla a continuación (**Fig. 2.9**, **Tabla 2.40**):

- *Retrotranscripción de ARN_m*: mezclar el ARN (2 µg) con el primer dT-*anchor* (0,5 µg de cada dT-*anchor*/µg ARN) en H₂O (volumen final 10 µl), incubar (70 °C, 5 min) y enfriar en hielo (5 min). Agregar tampón 5x (5 µl), dNTP 10 mM (2,5 µl), RT 22 U/µl (1,4 µl) y H₂O (6,1 µl). Incubar (60 min, 42 °C) y enfriar en hielo. La RT posee actividad RNasa H que específicamente hidroliza ARN del híbrido ARN:ADN_c.
- *PCR*: amplificar la cadena sintetizada de ADN_c (2 µl) con el *primer Anchor* y un *primer* específico (SP4) de la AAO (con la secuencia del extremo 3' del fragmento obtenido por PCR, **Apartado 2.13.3**). Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa y purificados con el *kit GENE CLEAN*.
- *Secuenciación*: ligar en el vector *pGEM-T Easy* y transformar *E. coli* DH5α. Extraer el plásmido recombinante con el *kit NucleoSpin plasmid* para su secuenciación.

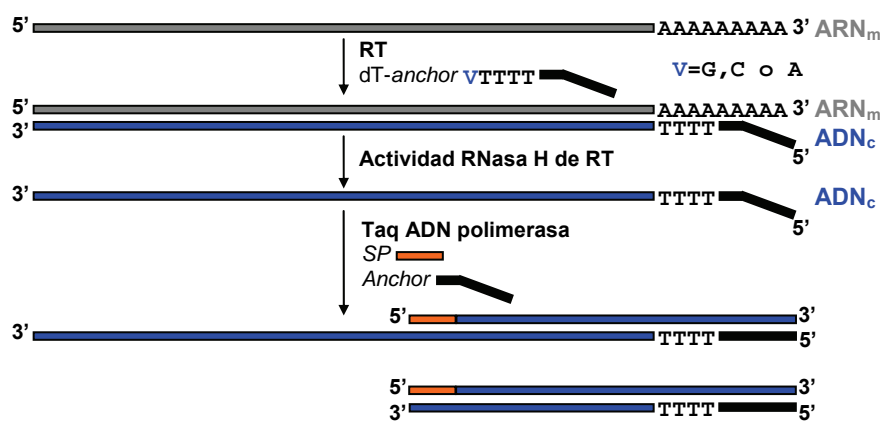


Fig. 2.9. Técnica RACE.

Tabla 2.40. *Primers para obtener el extremo 3' del gen AAO por RACE.*

Nombre	Secuencia 5'→3'	µM	T _h (°C)
dT- <i>anchor</i>	GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T) ₁₆ V	3,1	42
<i>Anchor</i>	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	0,25	62
SP4	ACCGCACGGGTCCCATGGTTG	0,25	

Concentración final en reacción de retrotranscripción de cada dT-*anchor* (V = G, C o A).

2.13.5. Identificación de intrones

El fragmento del gen de la AAO, obtenido por RACE, se amplificó por PCR convencional con ADN genómico para localizar los intrones. Además, se realizó una RT-PCR para amplificar la secuencia completa de ADN_c. Esto permitió confirmar la identificación de los intrones realizada en base a sus secuencias consenso. A continuación se explica el procedimiento realizado:

- **PCR:** se realizó con ADN genómico (238 ng), los *primers* SP5 y SP6 (1 µM; **Tabla 2.41**) y una T_h de 50 °C. Como se amplificaron muchas secuencias inespecíficas, se utilizó 1 µl de los productos de amplificación para repetir la PCR con una T_h de 52 °C.

Tabla 2.41. Primers para obtener intrones del extremo 3' del gen de la AAO.

Nombre	Secuencia 5'→3'
SP5	AGGTGAAGGAGCTGGTCAC
SP6	TAAATACACGATAGTAATATTGTC

- **RT-PCR:** se preparó una reacción de retrotranscripción según se indica en el **Apartado 2.13.4**, utilizando un *primer* específico del extremo 3' de la AAO (SP7). A continuación, la amplificación por PCR del ADN_c se realizó con un *primer* con la secuencia del extremo 5' de la AAO (SP8) y con SP7 (0,25 µM; **Tabla 2.42**). La T_h de esta reacción de PCR fue 62 °C.

Tabla 2.42. Primers para obtener el ADN_c completo del gen de la AAO.

Nombre	Secuencia 5'→3'
SP7	AATACACGATAGTAATATTGTCCGAG
SP8	CTACGTTCTTTACGGATGCATCAC

Los productos de amplificación de ambas técnicas (PCR y RT-PCR) fueron separados en un gel de agarosa, purificados con el *kit* **GENECLEAN** y ligados en el vector *pGEM-T Easy*. Finalmente, se extrajeron los plásmidos recombinantes de *E. coli* DH5α con el *kit* **NucleoSpin plasmid** y se secuenciaron.

2.14. ANÁLISIS *in silico* DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LA AAO DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

2.14.1. Modelado molecular

Se utilizó el programa *DeepView/Swiss-PdbViewer v3.7* y el servidor *SWISS-MODEL* (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) para generar un

modelo de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, por homología con la estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii* (PDB: 3FIM) y de la glucosa oxidasa de *A. niger* (PDB: 1CF3). Los programas *DeepView/Swiss-PdbViewer v3.7* y *PyMOL v0.99* sirvieron para visualizar y analizar las estructuras.

2.14.2. Análisis filogenético

Las relaciones evolutivas entre la AAO del anamorfo de *B. adusta* y diferentes flavoenzimas, se representaron mediante un árbol filogenético. Éste se realizó utilizando el método de *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987) mediante el programa *MEGA4* (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*).

3. RESULTADOS

3.1. IDENTIFICACIÓN DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

El hongo objeto de estudio fue aislado en medio agar malta de un CD deteriorado encontrado en Belice (García-Guinea *et al.*, 2001). En una primera aproximación, este organismo se identificó como un hongo de tipo *Geotrichum*. En este trabajo se ha completado su identificación en base a su morfología, la secuencia de su región ITS y las oxidorreductasas que secreta en medio sólido y líquido. Los resultados relacionados con estos aspectos se incluyen en los siguientes apartados. Éstos indican inequívocamente que el hongo aislado del CD es un nuevo anamorfo del basidiomiceto ligninolítico *B. adusta* (Romero *et al.*, 2007), según se discutirá posteriormente (**Apartado 4.1**).

3.1.1. Características morfológicas

El hongo aislado del CD desarrolló un micelio hialino en diferentes medios sólidos que incluyen únicamente una fuente de carbono (p. ej., glucosa, maltosa, sacarosa, almidón). Sin embargo, las colonias de esta especie fúngica fueron blancas y algodonosas en otros medios más nutritivos (p. ej., Kirk, Kimura, glucosa-peptona-extracto de levadura, patata, tomate, soja).

La **Fig. 3.1** muestra la velocidad de crecimiento del anamorfo de *B. adusta* en cultivo sólido, según la composición del medio y del tiempo de incubación (28 °C). En todos los medios testados el crecimiento fue rápido, aunque, durante los primeros 5 días de incubación, la velocidad de crecimiento fue superior en el medio de almidón de patata y en el de extracto de malta, mientras que el crecimiento más lento se observó en el medio con glucosa. En comparación con este último, la velocidad de crecimiento en el medio glucosa-peptona-extracto de levadura fue ligeramente superior pero únicamente durante los primeros 5 días.

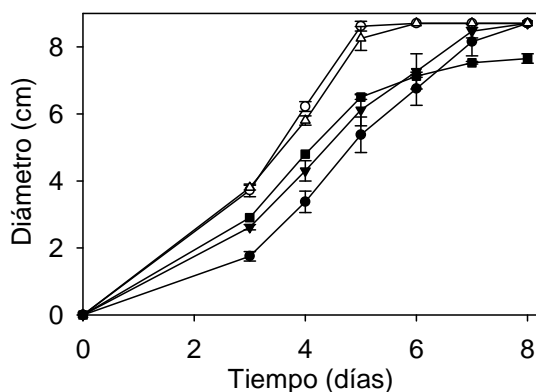


Fig. 3.1. Velocidad de crecimiento de las colonias del hongo aislado del CD en medio sólido con extracto de malta (○), glucosa (●), sacarosa (▼), almidón (△) o con glucosa-peptona-extracto de levadura (■). Se utilizaron placas de Petri de 9 cm.

Como se observa en la **Fig. 3.2A** el hongo aislado del CD presenta hifas septadas ($\sim 3 \mu\text{m}$) y generalmente con ramificación dicotómica, carece de fibulas y libera esporas asexuales por fragmentación (artroconidios, $\sim 5 \times 7 \mu\text{m}$). En ninguna de las condiciones estudiadas produjo formas de reproducción sexual. En la **Fig. 3.2B** se observan las hifas de una cepa de *B. adusta* (IJFM A-786), que se reproduce sexualmente. Ésta presenta fibulas, como la mayoría de los basidiomicetos.

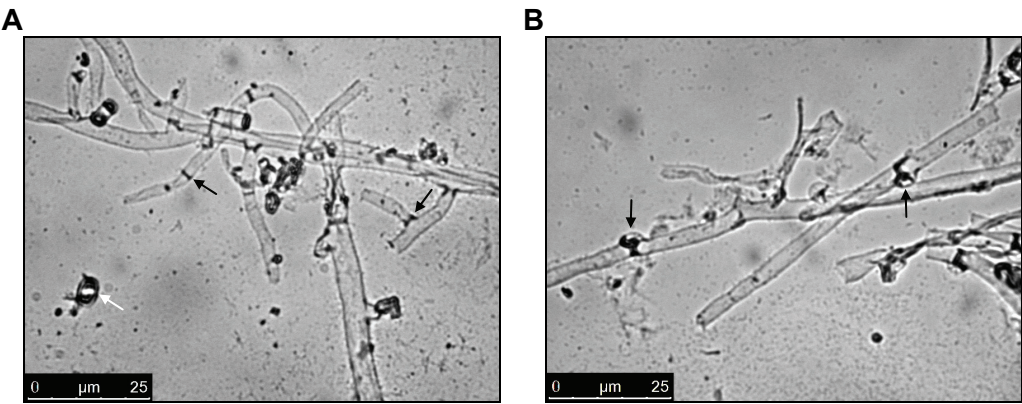


Fig. 3.2. Imágenes de microscopía óptica (campo claro) con hifas del hongo aislado del CD (A) y de un teleomorfo de *B. adusta* (B). Las flechas negras señalan septos sin fibulas en A y las fibulas en B. La flecha blanca indica uno de los artroconidios en A.

3.1.2. Secuencia de las regiones ITS1, 5,8S e ITS2

Se amplificó una secuencia del ADN_r de 604 pb utilizando el ADN genómico del hongo aislado del CD y los *primers* universales ITS1 e ITS4 (**Fig. 3.3**). Esta secuencia se depositó en el *GenBank* con el número de acceso EF441742.1, e incluye las regiones ITS1, 5,8S e ITS2. Presenta un 99% de identidad de secuencia con varias cepas de *T. cucumeris* (*GenBank*: AF455463.1, AF455459.1, AF455445.1 y AF455438.1), dos basidiomicetos no identificados (*GenBank*: AF455454.1 y AJ279471.1) y varias cepas de *Bjerkandera* sp. y *B. adusta* (*GenBank*: DQ060096.1, DQ060095.1, AY633927.1 y AY089741.1).

```
1 CTGCGGAAGG ATCATTATCG AGTTTTGAAC GGGTTGTCTG CTGGCTCGCA AGGCATGTG CAGCCTGTGC
71 TCATCCACTC TCAACTTCTG TGCACCTTTC ATAGGCCGGC TTGTGGGTGC GTTCGCGCAC TTGTAGGTGT
141 CGGGCTTATG CTTTACTACA AACGATTTCAG TTTTAGAATG TCATACTTTG CTATAACGCA ATTTATATAC
211 AACTTTCAGC AACGGATCTC TTGGCTCTCG CATCGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA AGTAATGTGA
281 ATTGCAGAAT TCAGTGAATC ATCGAATCTT TGAACGCACC TTGCGCTCCT TGGTATTCGG AGGAGCATGC
351 CTGTTTGAGT CTCATGGAAT TCTCAACCTT CGGCTTTATT GACGAAGGCT TGGACTTGGA GGTTCGTGCCG
421 GCTCTCGTAG TCGGCTCCTC TGAAATGCAT TAGTGCGAAC GTTACCAGCC GCTTCAGCGT GATAATTATC
491 TGCCTTGCTG TGGAGGGTAT TCTAGTGTTC GCGCTTCTAA CCGTCTTCGG ACAAATTCTT GAACTCNGAG
561 CTCAAATCAG GTAGGACTAC CCGCTGAACT TAAGCATATC AATA
```

Fig. 3.3. Secuencia de las regiones ITS1, 5,8S, e ITS2 del anamorfo de *B. adusta*.

3.1.3. Oxidorreductasas e hidrolasas extracelulares

Se detectaron varias actividades enzimáticas en cultivos líquidos y sólidos del hongo aislado del CD. A continuación se indican sus niveles y condiciones de producción.

3.1.3.1. Cultivos en medios sólidos con ABTS

Se prepararon cultivos sólidos del anamorfo de *B. adusta* y de *B. adusta* TM Ud1 en tres medios diferentes con ABTS. De esta forma, se estudió la producción de oxidorreductasas con actividad sobre este compuesto. Entre estas enzimas se incluyen las lacasas y las peroxidasas ligninolíticas, que producen el radical catiónico de este sustrato. La producción de este radical implica la formación de un halo coloreado sobre la superficie del agar.

El hongo aislado del CD presentó actividad sobre el ABTS sólo en el medio agar Kirk-ABTS, que es el único de los tres medios ensayados que contiene Mn^{2+} (**Fig. 3.4A, C y E**). Sin embargo, la cepa *B. adusta* TM Ud1 oxidó además este compuesto en el medio agar zumo de tomate y ocasionalmente en el de harina de soja (**Fig. 3.4B, D y F**). Este método no permite discernir entre actividad lacasa y peroxidasa. Sin embargo, el hongo aislado del CD oxidó el ABTS sólo en presencia de Mn^{2+} , lo que sugiere que la actividad de esta especie fúngica sobre el ABTS se debe a la producción de una enzima dependiente de este catión, como la MnP.

3.1.3.2. Cultivos en medio líquido

En cultivos del anamorfo de *B. adusta* en medio Kimura con $MnSO_4$ 500 μM , se determinó la secreción de lacasas, peroxidasas, AAO y esterases (200 ml/matraz, 150 rpm, 28 °C). También se monitorizó en estos cultivos la concentración de sustancias reductoras, proteínas totales y el pH (**Fig. 3.5**). Se detectaron máximos de actividad AAO (~ 400 mU/ml sobre veratrílico) y de peroxidasa dependiente de Mn^{2+} (~ 140 mU/ml sobre $MnSO_4$) a los 7 y 9 días de incubación, respectivamente. Además, se registraron niveles bajos de actividad esterasa (~ 1-16 mU/ml sobre *p*NPB), con un máximo a los 9 días. En estas condiciones no se detectó actividad lacasa, LiP ni VP. Los azúcares reductores alcanzaron concentraciones basales a los 7 días de incubación y un día después se detectaron los niveles más elevados de proteína total. El pH fue próximo a 5,5 durante los primeros 7 días, aumentó hasta 7,2 a los 9 días y durante el resto de la incubación incrementó progresivamente hasta 8,6.

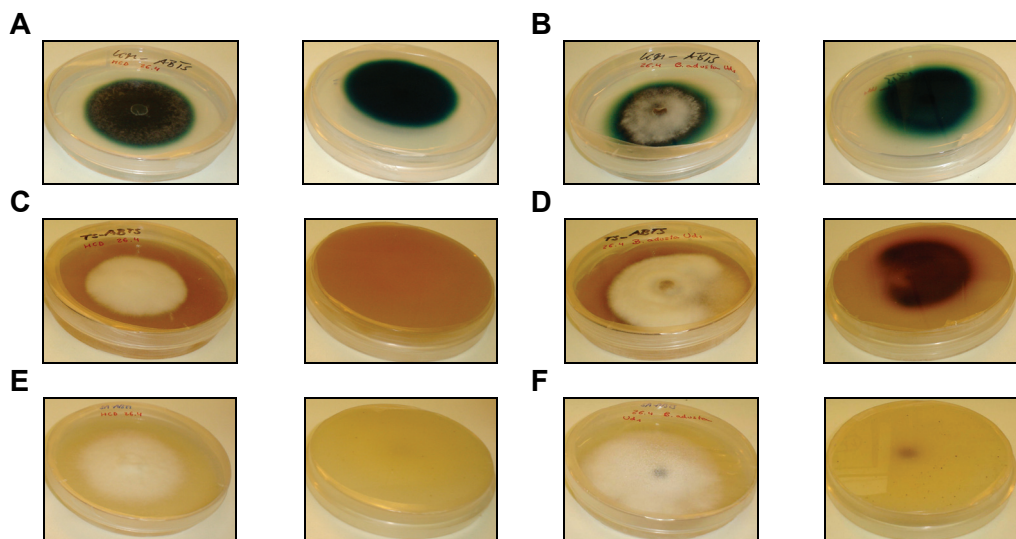


Fig. 3.4. Cultivos sólidos del anamorfo de *B. adusta* (A, C, E) y de la cepa *B. adusta* TM Ud1 (B, D, F) en tres medios con ABTS. Medio Kirk (A y B), zumo de tomate (C y D) y harina de soja (E y F) (6 días, 24 °C).

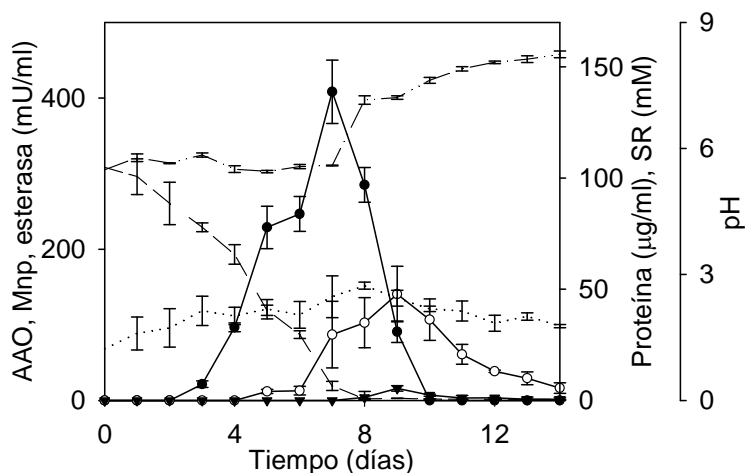


Fig. 3.5. Evolución de los niveles de AAO (●), MnP (○), esterasa (▼), sustancias reductoras (SR, ---) y proteínas (----) y de los valores de pH (---) en los cultivos del anamorfo de *B. adusta*.

Se prepararon cultivos del anamorfo de *B. adusta* con diferentes concentraciones de MnSO_4 y aceite de oliva, con objeto de inducir la producción de peroxidasas y esterases, respectivamente (50 ml/matraz, 150 rpm, 28 °C). Como se observa en la Fig. 3.6D, el Mn^{2+} tiene un efecto positivo en los niveles

de actividad peroxidasa (determinada con MnSO_4 como sustrato), siendo la concentración óptima de este catión $500\ \mu\text{M}$. Sin embargo, los niveles de AAO disminuyen ligeramente con concentraciones superiores a $100\ \mu\text{M}$ de Mn^{2+} en el cultivo (**Fig. 3.6D**). La actividad esterasa (sobre *p*NPB) se indujo sólo ligeramente con aceite de oliva al 0,5% ($\sim 30\ \text{mU/ml}$ a los 10 días), pero se detectaron niveles superiores de esta enzima en los cultivos con aceite al 1% ($\sim 185\ \text{mU/ml}$ a los 14 días) (**Fig. 3.6A, B y C**). Con ambas concentraciones de aceite, los máximos de actividad esterasa coincidieron con concentraciones elevadas de proteína total (~ 90 y $130\ \mu\text{g/ml}$, respectivamente), niveles basales de azúcares reductores y un pH próximo a 8,0. En presencia de aceite de oliva al 1%, se prolongó el tiempo de producción de la AAO en los cultivos fúngicos.

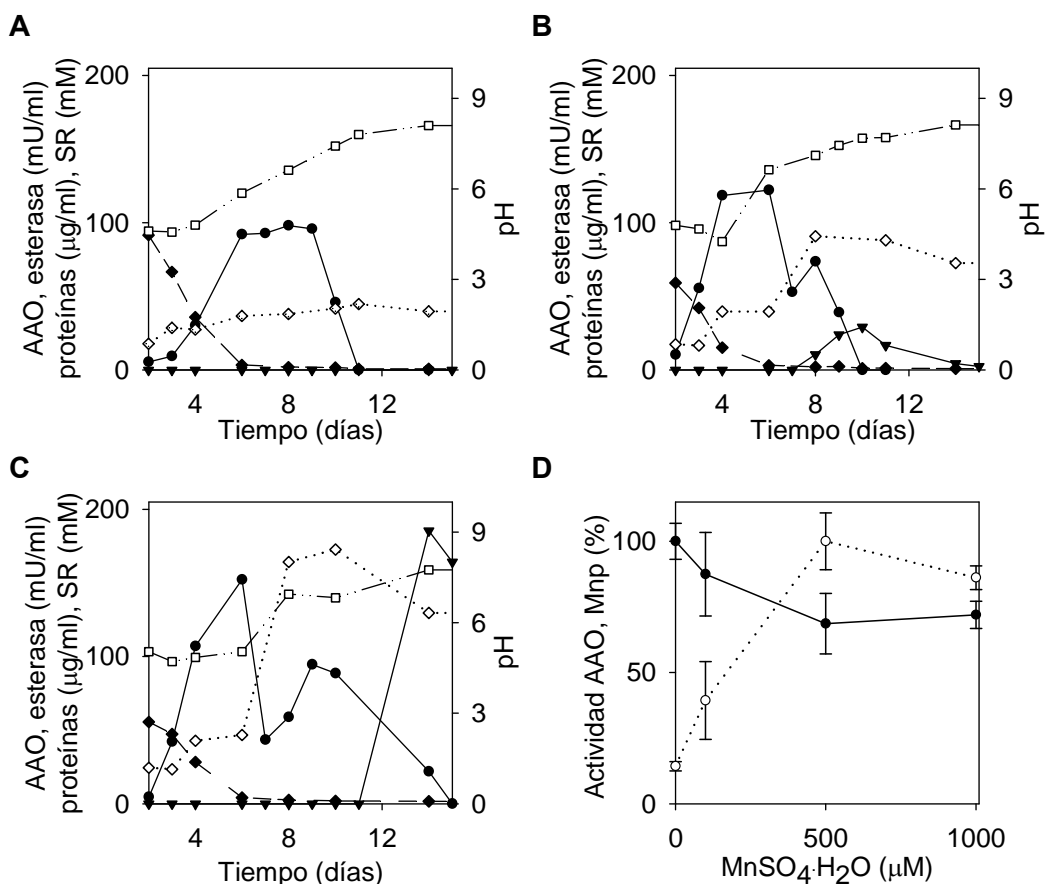


Fig. 3.6. Efecto de diferentes concentraciones de aceite de oliva sobre los niveles de esterasa (▼) (A, B y C con 0, 0,5 y 1%, respectivamente) e influencia del MnSO_4 en los niveles de MnP (○) (D). En A, B, C y D se muestra también la actividad AAO (●) y en A, B y C se representa el pH (□) y la concentración de SR (◆) y de proteínas totales (◇).

3.2. DEGRADACIÓN DE CD *in vitro* POR EL ANAMORFO DE *B. adusta*

3.2.1. Colonización de CD-A y CD-R

La **Fig. 3.7** muestra CD-A y CD-R comerciales incubados en cultivos del anamorfo de *B. adusta* en medio agar malta (28 °C, 100% de humedad). Ambos tipos de CD fueron colonizados por el hongo y presentaron un patrón de degradación similar al del CD-A encontrado en Belice (**Fig. 1.14**). Sin embargo, la colonización fue más rápida en los CD-R. En todos los casos, la biodegradación de los CD estuvo facilitada por las hendiduras que se realizaron previamente en las capas que cubren el policarbonato.

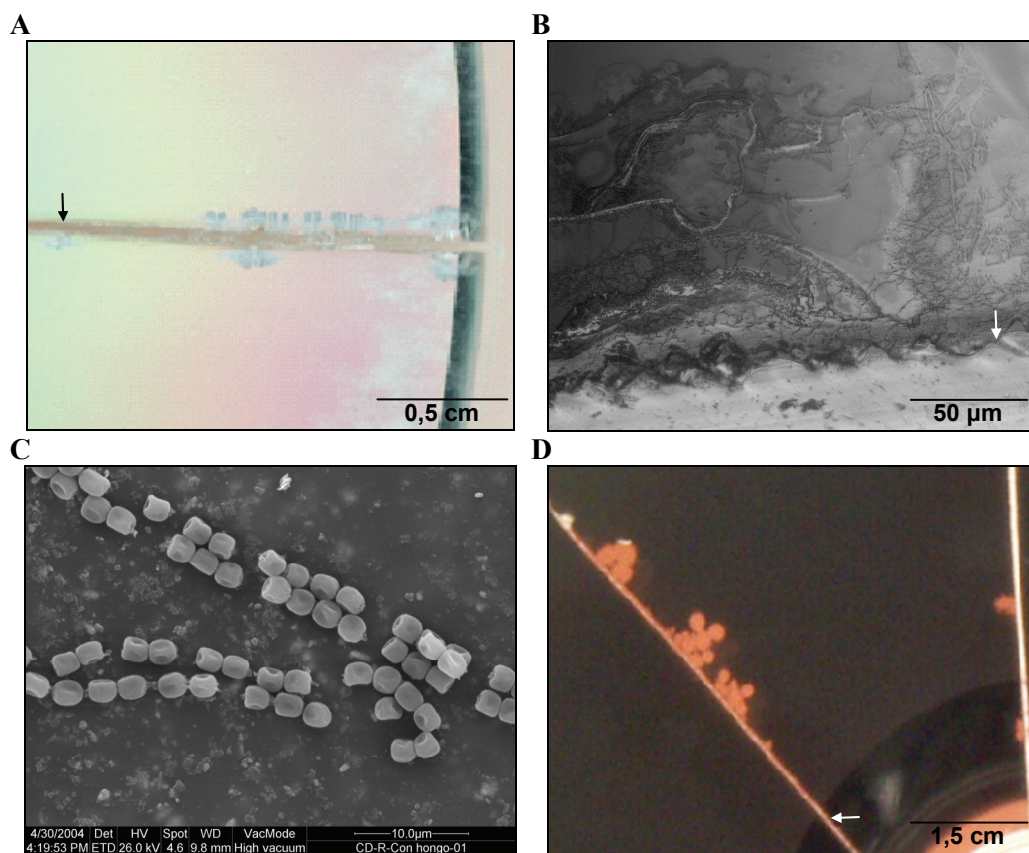


Fig. 3.7. CD-R (A, B y C) y CD-A (D) colonizados por el anamorfo de *B. adusta* en cultivo sólido. El tiempo de incubación fue de 3 y 6 meses en los CD-R y los CD-A, respectivamente. En A, B y D se muestra el reverso de los CD y en C la capa superior. Las flechas indican las hendiduras realizadas. En B se muestra un detalle de A, examinado con un microscopio de contraste de fases. La imagen de SEM (C) muestra los artroconidios del hongo sobre el CD. La imagen D fue obtenida de Speranza *et al.* (resultados no publicados).

3.2.2. Deterioro de los componentes de los CD

En este apartado se incluyen los resultados de varios análisis que ponen de manifiesto la capacidad del anamorfo de *B. adusta* de degradar o deteriorar los principales materiales que constituyen los CD.

3.2.2.1. Deterioro de colorantes

Se incubaron CD-R sobre cultivos sólidos del anamorfo de *B. adusta* en medio agar malta (28 °C, 100% de humedad). En la **Fig. 3.8** se muestra uno de estos CD con la capa de colorante deteriorada tras la incubación. Como se mencionó anteriormente, en estos CD la capa de colorante sirve para almacenar la información y en este caso era de tipo ftalocianina. Las hendiduras realizadas con una cuchilla facilitaron la degradación, lo que indica que las capas superiores protegen a la capa de colorante.



Fig. 3.8. CD-R incubado en un cultivo sólido del anamorfo de *B. adusta* durante 3 meses. La flecha señala una de las hendiduras realizadas. La imagen muestra la capa superior del CD. Obtenida de Speranza *et al.* (resultados no publicados).

Se prepararon diferentes cultivos sólidos del anamorfo de *B. adusta* en medio Kimura con 500 μ M de MnSO_4 y 50 mg/L de colorantes de diversa estructura química (azo, indigoide, ftalocianina, antraquinónico, triarilmetano, y heterocíclico). Ninguno de estos colorantes ralentizó el crecimiento fúngico y en todos los cultivos se observó un micelio blanco y algodonoso, como el del control sin colorante, durante toda la incubación (28 °C). La **Fig. 3.9** muestra que todos los compuestos testados fueron decolorados por el anamorfo de *B. adusta*. Los que decoloró más rápidamente fueron el *Acid orange 52* y el *Acid blue 74* (~

90% a los 5 días). El hongo también actuó eficazmente sobre el RB5 y el *Reactive blue 19* (~ 95-100% a los 8 días). Los colorantes más recalcitrantes fueron el *Azure B*, la sal tetrasódica de la tetrasulfonatoftalocianina de níquel (II) y el *Acid orange 7*. En todos los cultivos, incluidos los controles sin colorante, se observó una coloración marrón (con distinta intensidad según el colorante) que, como se comprobó en los cultivos líquidos, podría deberse a la producción de peroxidasas con actividad sobre Mn^{2+} .

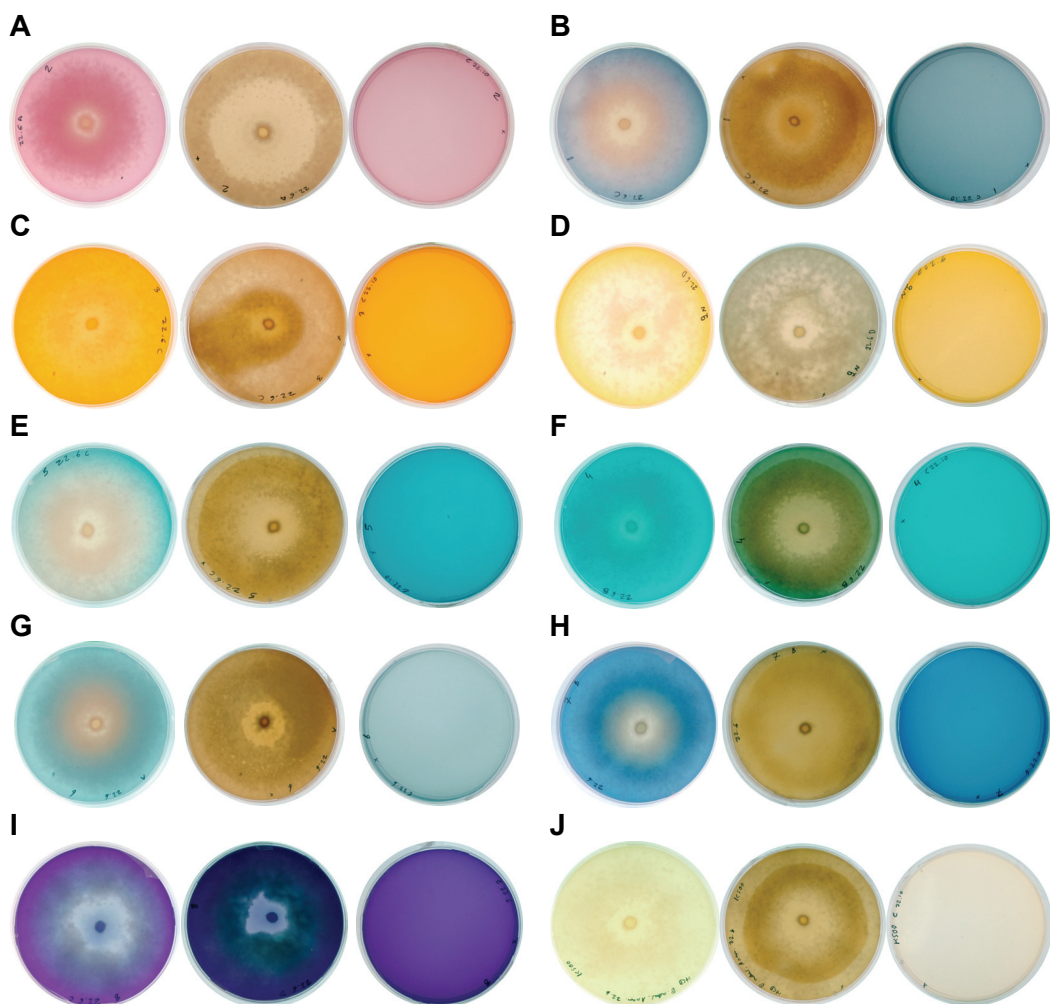


Fig. 3.9. Cultivos sólidos del anamorfo de *B. adusta* con diferentes colorantes. *Reactive violet 5* (A), RB5 (B), *Acid orange 7* (C), *Acid orange 52* (D), *Acid blue 74* (E), sal tetrasódica de la tetrasulfonatoftalocianina de níquel (II) (F), *Reactive blue 19* (G), *Acid blue 93* (H), *Azure B* (I) y control sin colorante (J). Se muestra, de izquierda a derecha, la parte inferior de placas con cultivos a los 5 y 19 días de incubación y con un control sin inocular a los 19 días.

3.2.2.2. Deterioro de aluminio

Se estudió la degradación de la capa de Al de los CD durante su incubación en cultivos sólidos y líquidos del anamorfo de *B. adusta*. Concretamente, se utilizaron fragmentos de CD-A obtenidos tras la segunda y la tercera etapa del proceso de fabricación (policarbonato cubierto sólo con Al o con Al y laca).

En primer lugar, se prepararon los cultivos fúngicos en medio agar malta y tras 10 días de incubación (28 °C) se depositaron los fragmentos de CD sobre el micelio. La **Fig. 3.10** muestra un fragmento de CD sin laca a diferentes tiempos de incubación. En este CD se deterioró progresivamente la capa de Al que cubre el policarbonato. Los primeros signos de degradación, en la superficie metálica, se observaron a los 15 días de incubación y su deterioro fue muy drástico a los 2 meses. En los CD con la capa de laca, el proceso de degradación del Al fue similar aunque considerablemente más lento. En éstos se observaron los primeros indicios de degradación a los 2 meses de incubación.

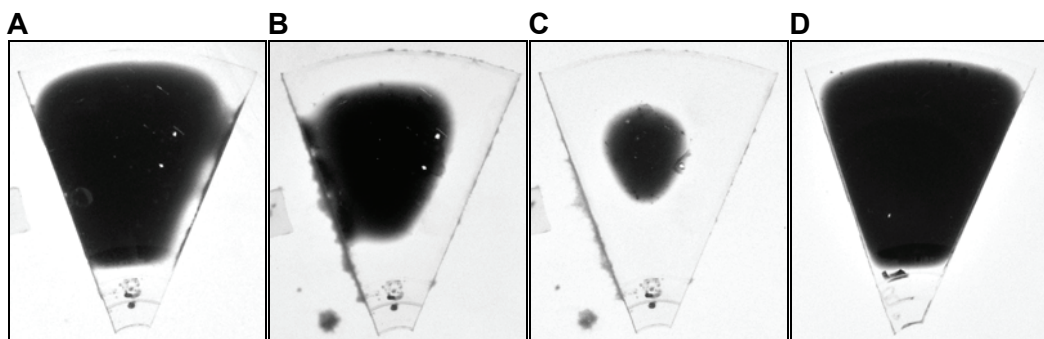


Fig. 3.10. Degradación progresiva de Al en CD-A incubados en cultivos sólidos del anamorfo de *B. adusta*. Fragmento de CD (1/8), sin la capa de laca y sin la etiqueta, a los 15 (A), 30 (B) y 60 (C) días de incubación y control sin inocular a los 60 días (D).

En el caso de los ensayos en cultivos líquidos, se incubaron fragmentos más pequeños de CD-A (~ 2,5 x 2,5 x 1 mm) compuestos de policarbonato, Al y laca o únicamente de policarbonato y Al (50 ml/matraz, 28 °C, 150 rpm). En primer lugar, se utilizó el medio de cultivo Czapek-Dox modificado. Se agregaron los fragmentos de CD a los cultivos fúngicos tras 5 días de incubación (pH ~ 4,0). A los 20 días de incubación en presencia de CD, se cuantificó el Al remanente en los fragmentos de CD, en el micelio y en el líquido de cultivo mediante ICP-OES. La mayor parte del Al de los CD sin laca (96,3%) se detectó en el micelio y en el líquido de cultivo. Sin embargo, la concentración de Al remanente en los CD con laca fue superior (68,9%) (**Fig. 3.11A y B**). El pH de los cultivos fúngicos durante la incubación de los CD osciló entre 4,0 y 8,0. En los controles sin inocular a pH 5,1, una proporción reducida del Al de los CD cubiertos con

laca se liberó al líquido durante la incubación y ésta fue considerablemente superior en los CD sin laca (**Fig. 3.11D y E**). Estos resultados indicaron que el pH ácido de los controles favorecía la solubilización del Al y puso de manifiesto la eficacia de la laca en la protección de la capa metálica.

Se realizó un experimento similar en medio Kimura, únicamente con fragmentos de CD sin laca. Éstos se agregaron a los cultivos tras 10 días de incubación (pH ~ 7,0). En este caso, los cultivos fúngicos presentaron valores de pH básicos durante toda la incubación de los CD y se prepararon controles sin inocular a diferentes pH (5,5, 7,0 y 8,0). La concentración de Al que se liberó de los CD tras 20 días de incubación en los cultivos fúngicos (~ 89,0%) (**Fig. 3.11C**) fue similar a la del ensayo anterior en medio Czapek Dox modificado (con CD sin laca). En los controles sin inocular a pH básicos prácticamente no se liberó Al (**Fig. 3.11F**), lo que indicó que el anamorfo de *B. adusta* era el agente responsable de la degradación del metal en los CD.

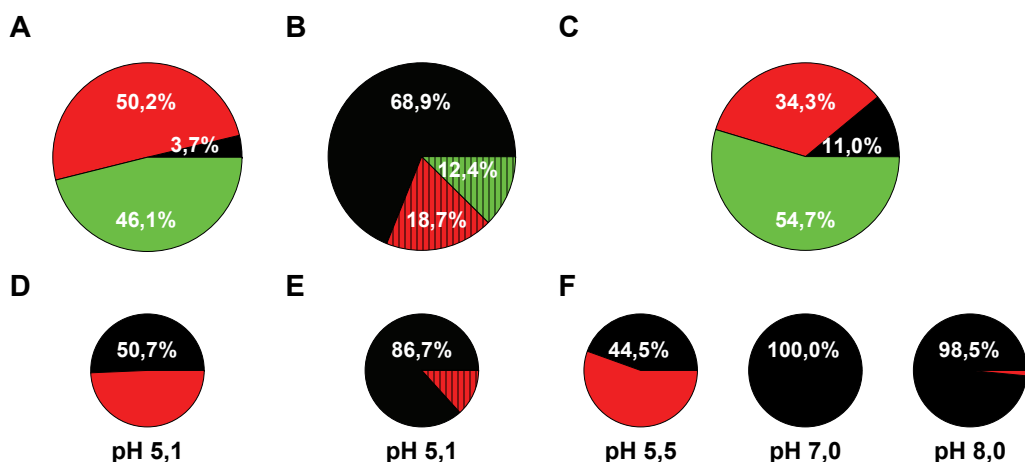


Fig. 3.11. Concentración de Al en fragmentos de CD-A (negro), en el líquido de cultivo (rojo) y en el micelio del anamorfo de *B. adusta* (verde). Fragmentos de CD compuestos sólo de policarbonato y Al (A y C) o de policarbonato, Al y laca (B). Medio de cultivo Czapek-Dox modificado (A y B) y Kimura (C). Los controles sin inocular, de A, B y C, se muestran en la parte inferior de la imagen y se indica su pH (D, E y F, respectivamente).

Se analizó por HPLC el líquido de cultivo del anamorfo de *B. adusta*, con objeto de identificar ácidos orgánicos que podrían estar implicados en la solubilización del Al de los CD. Estos análisis se realizaron únicamente con los cultivos en medio Czapek-Dox modificado, en ausencia y presencia de fragmentos de CD. La **Fig. 3.12** muestra el cromatograma obtenido, tras 30 días de incubación, de un cultivo sin fragmentos de CD. Un perfil similar se obtuvo analizando los cultivos incubados en presencia de fragmentos de CD. Los

tiempos de retención de 4 componentes de la muestra (9,490, 11,857, 12,530 y 20,473 min) coinciden con los de los ácidos oxálico, cítrico, tartárico y acético utilizados como patrones (9,553, 11,863, 12,530, y 20,823 min, respectivamente). En el cromatograma del control sin inocular sólo se observó un compuesto con un tiempo de retención próximo a uno de los patrones (12,560 min). Éste podría ser ácido tartárico procedente de tartrato amónico, que es uno de los componentes del medio de cultivo utilizado.

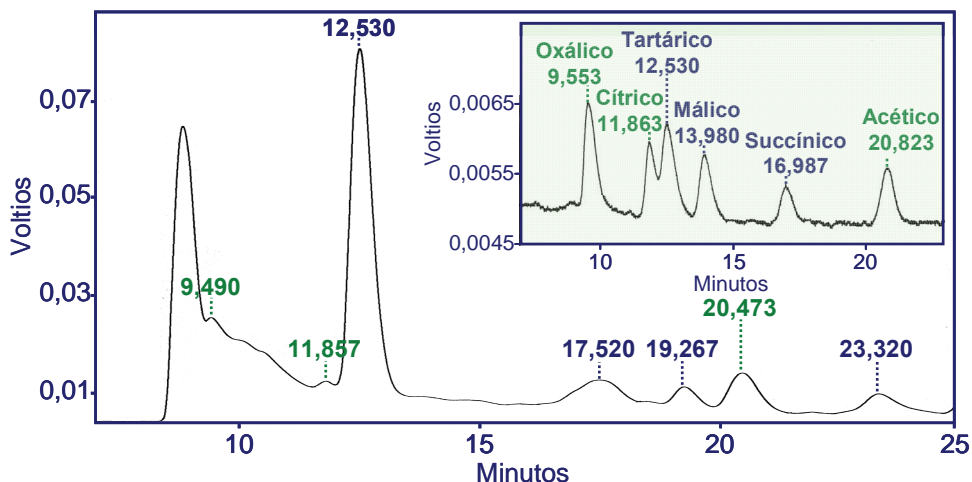


Fig. 3.12. Cromatograma del líquido de cultivo del anamorfo de *B. adusta*. La figura insertada, en la parte superior derecha del cromatograma, muestra los tiempos de retención de los ácidos orgánicos utilizados como patrones. Se utilizó una columna *Supelcogel C-610 H*, a 210 nm.

3.2.2.3. Deterioro de policarbonato de BPA

Se estudió la capacidad del anamorfo de *B. adusta* para degradar policarbonato en medio Kimura. Para ello, se agregaron a los cultivos fúngicos fragmentos de CD-A y de CD-R (~ 2,5 x 2,5 x 1 mm), que se analizaron mediante SEM a diferentes tiempos de incubación (50 ml/matraz, 28 °C, 150 rpm).

La **Fig. 3.13** corresponde a CD-A obtenidos tras la primera fase del proceso de fabricación (policarbonato grabado). En ella se muestra el deterioro progresivo de los *pits* y los *lands* en los cultivos. Así, los *pits* están dañados tras 1 mes de incubación y no se observan a los 2 meses. En los fragmentos de CD-A que incluyen además la capa de Al, el patrón de degradación de los *pits* y los *lands* fue similar. Sin embargo, la degradación de estas estructuras fue menos acusada en los fragmentos recubiertos de laca o con todas las capas (**Fig. 3.14A**). En el caso de estos últimos, fueron necesarios 2 meses de incubación para

observar que algunas regiones próximas a las hifas carecían de *pits* y que en otras zonas los *pits* y los *lands* estaban deformados.

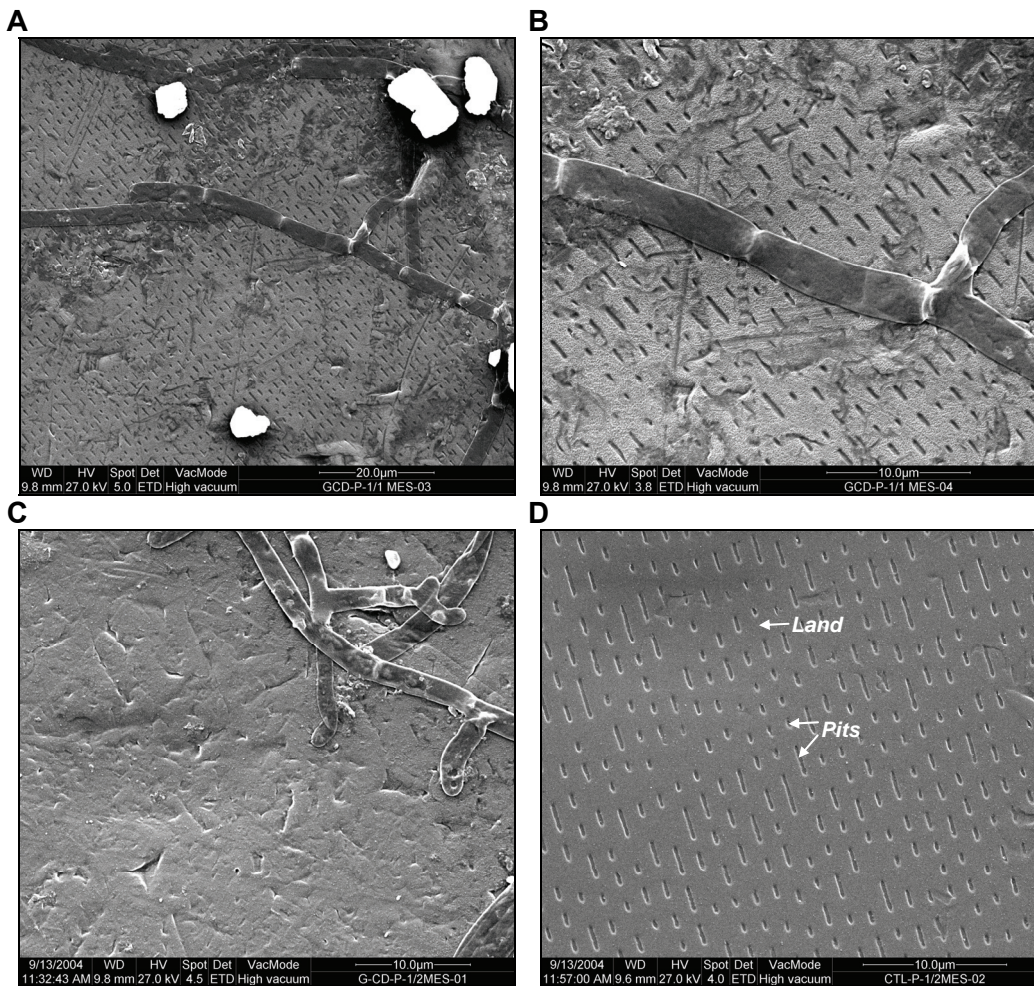


Fig. 3.13. Imágenes de SEM de fragmentos de policarbonato grabado tras su incubación en cultivos líquidos del anamorfo de *B. adusta* durante 1 mes (A y B) o 2 meses (C). B es un detalle ampliado de A. D corresponde a un control sin inocular tras 2 meses de incubación.

En los CD-R se observó un deterioro considerable de su superficie a los 2 meses de incubación (**Fig. 3.14C**). Los surcos excavados sobre la lámina de policarbonato (para guiar al láser durante la reproducción) parecen mermados y las superficies rugosas y profusamente erosionadas en algunos sectores.

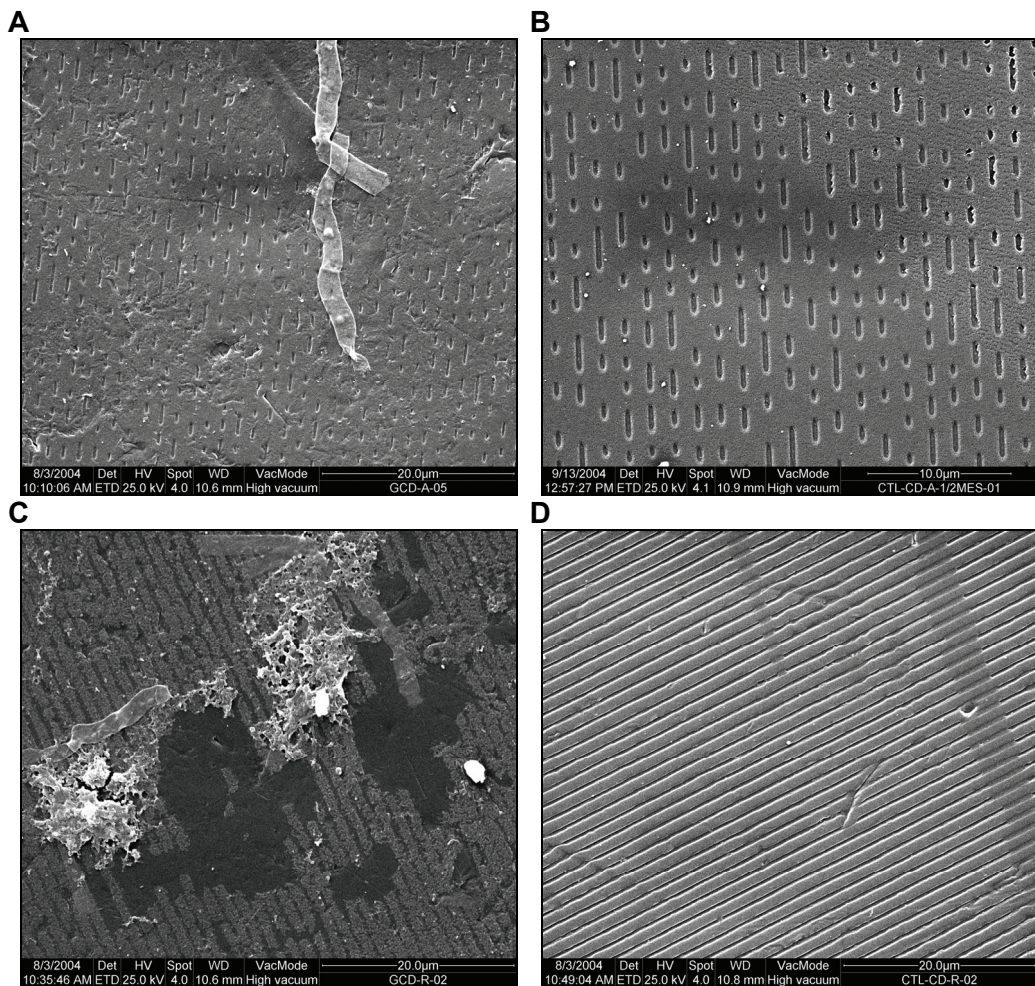


Fig. 3.14. Imágenes de SEM de fragmentos de CD-A (A) y CD-R (C) comerciales tras 2 meses de incubación en cultivos líquidos del anamorfo de *B. adusta*. Controles sin inocular (B y D, respectivamente).

Con objeto de detectar los compuestos resultantes de la degradación del policarbonato, se analizaron, por HPLC, cultivos del anamorfo de *B. adusta* realizados en medio Kimura en presencia y ausencia de diferentes formas de este polímero (50 ml/matraz 250 ml, 28 °C y 150 rpm). Concretamente, se utilizó policarbonato pulverizado, granulado o laminado. La **Fig. 3.15** muestra el cromatograma obtenido de un cultivo con policarbonato pulverizado tras 30 días de incubación. En éste se identificó BPA, en base a su tiempo de retención y a su espectro de absorción. El control sin inocular presentó sólo trazas de este compuesto. Los cultivos con las otras formas de policarbonato (granulado y

laminado) presentaron cromatogramas similares pero cantidades muy reducidas de BPA.

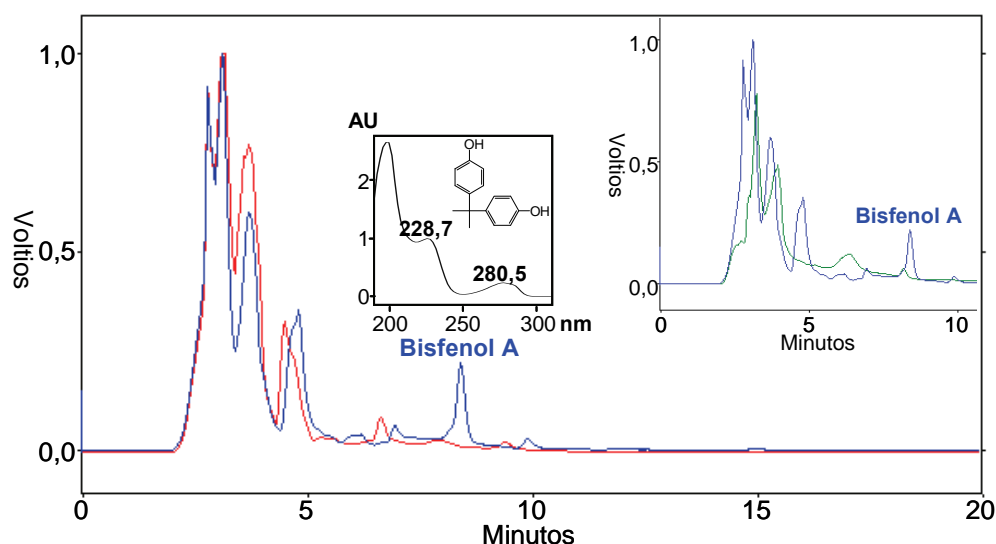


Fig. 3.15. Cromatograma (azul) del líquido de cultivo del anamorfo de *B. adusta* preparado con polycarbonato en polvo. Control inoculado sin polycarbonato (rojo) y espectro de absorción del BPA obtenido con un detector de diodos (negro). En el cromatograma insertado se compara el cultivo con polycarbonato pulverizado (azul) y el control con el mismo tipo de polycarbonato sin inocular (verde). Se utilizó una columna de fase reversa (*Purospher STAR RP-18*), a 230 nm.

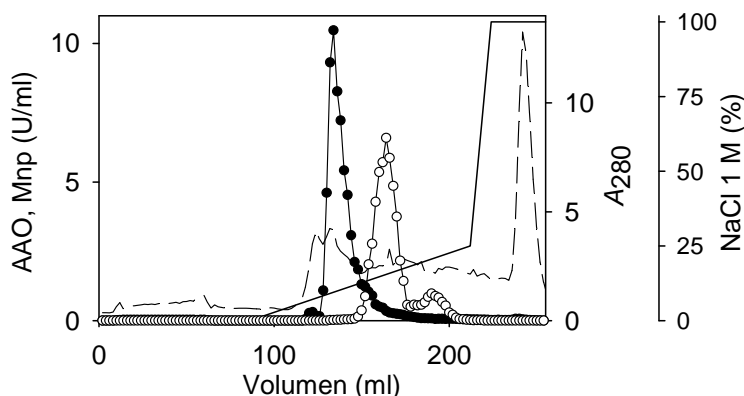
3.3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA AAO DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

3.3.1. Etapas y rendimiento de la purificación

Se purificó la AAO secretada por el anamorfo de *B. adusta* de cultivos con 7 días de incubación en medio Kimura (200 ml/matraz, 28 °C y 150 rpm). Estos cultivos incluían MnSO_4 (500 μM) para inducir la producción de MnP y purificar estas peroxidasas con los mismos crudos (**Apartado 3.5**). El líquido de cultivo se separó del micelio filtrando al vacío a través de papel de filtro y se concentró y dializó utilizando un equipo de ultrafiltración tangencial. El proceso de purificación de la AAO constó de tres pasos cromatográficos con un rendimiento final del 62,0% (**Tabla 3.1**). Este proceso se monitorizó a 280 nm para detectar las proteínas totales y también a 465 nm para detectar a la AAO. En las fracciones con absorbancia a 465 nm se valoró la actividad sobre veratrílico. Tras la primera cromatografía, en una columna de intercambio iónico de baja eficacia, las fracciones con actividad AAO se separaron de las que presentaban

actividad MnP y de la mayor parte de los componentes del medio (**Fig. 3.16A**). Las fracciones con AAO se concentraron y dializaron con una célula de ultrafiltración y a continuación se aplicaron a una columna de intercambio iónico de alta eficacia (**Fig. 3.16B**). Finalmente, las fracciones con actividad sobre veratrílico se concentraron por centrifugación utilizando dispositivos de ultrafiltración y se aplicaron a una columna de exclusión molecular (**Fig. 3.17A**). Tras este último paso de purificación, la relación A_{280}/A_{465} fue aproximadamente 10. Se analizaron diferentes muestras, obtenidas durante el proceso de purificación, mediante electroforesis (**Fig. 3.17B**).

A



B

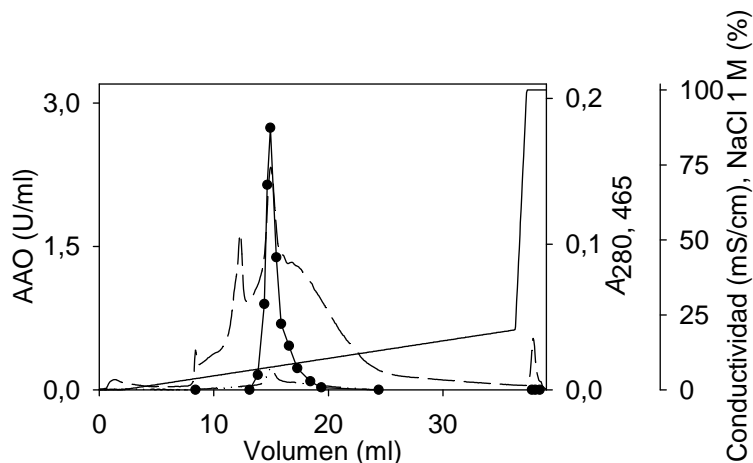


Fig. 3.16. Perfiles cromatográficos del crudo enzimático del anamorfo de *B. adusta* durante la purificación de la AAO (A y B) y de las MnP (A). **A)** Cromatografía en *HiTrap-Q* del crudo enzimático. **B)** Cromatografía en *Mono-Q* de las fracciones con actividad AAO recogidas tras *HiTrap-Q*. Se muestra la actividad AAO (●) y MnP (○), la A_{280} (---) y la A_{465} (---) y el gradiente de NaCl teórico (—).

Tabla 3.1. Balance del proceso de purificación de la AAO del anamorfo de *B. adusta*.

Etapas	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U·mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Cultivo	534	85,7	6,2	100,0	1,0
HiTrap-Q	531	20,8	25,5	99,5	4,1
Mono-Q	395	12,6	31,3	74,3	5,0
Superdex-75	245	5,5	44,8	62,0	7,2

Se determinó la concentración de proteína total con el Bio-Rad protein assay.

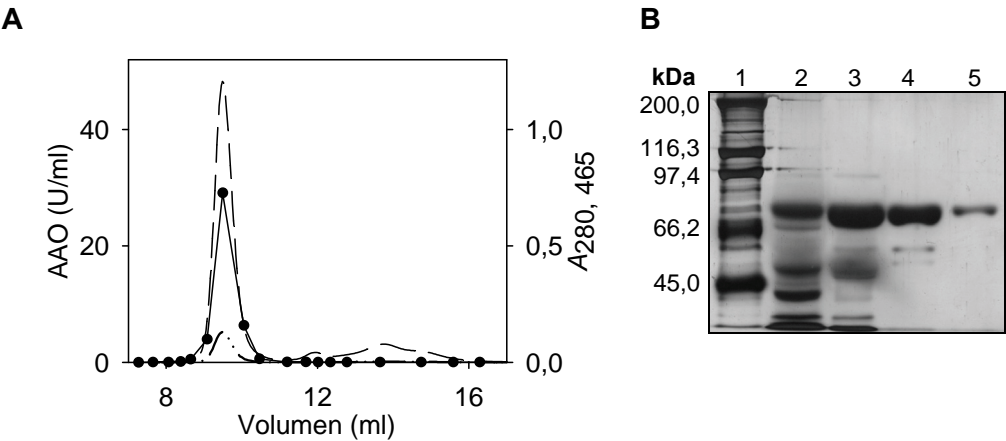


Fig. 3.17. Perfil cromatográfico del último paso de purificación de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (A) y gel de electroforesis de las proteínas recogidas tras las distintas etapas del proceso de purificación (B). A) Cromatografía de exclusión molecular en *Superdex-75*. Se muestra la actividad AAO (●), la A_{280} (---) y la A_{465} (---). B) Gel teñido con Ag. Muestras: 1, marcadores de masa molecular; 2, crudo enzimático; 3, *HiTrap-Q*; 4, *Mono-Q*; y 5, *Superdex-75*.

3.3.2. Características fisicoquímicas

3.3.2.1. Masa molecular

La masa molecular aproximada de la AAO, determinada mediante SDS-PAGE, es de 75,935 kDa (Fig. 3.17B) y, en base a la cromatografía de exclusión molecular, se estimó un valor aproximado de 72,171 kDa. La masa molecular exacta de esta proteína, calculada por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, es de 76,069 kDa. Estos resultados confirmaron la naturaleza monomérica de la AAO del anamorfo de *B. adusta*.

3.3.2.2. Punto isoeléctrico

Se determinó el pI de la AAO en geles horizontales de poliacrilamida revelados por dos métodos distintos. En estos geles, la AAO purificada presentaba generalmente varias bandas de actividad, pero tras su desglicosilación con Endo

H sólo se observaba una banda (**Fig. 3.18A**). Esto indicó que durante el proceso de purificación se pueden producir diferentes formas de glicosilación. Se calculó un pI para la AAO próximo a 4,45, interpolando en una recta de calibrado con un gradiente lineal de pH de 3,0 a 6,0. Mediante estos ensayos se pudo comprobar que para visualizar adecuadamente las bandas de AAO en un zimograma se requieren 20-30 mU.

3.3.2.3. Grado de glicosilación

Para determinar el grado de glicosilación de la AAO, se comparó su movilidad electroforética con la de una muestra tratada con Endo H (**Fig. 3.18B**). De esta forma, se estimó que la masa molecular de la AAO desglicosilada es de 70,314 kDa. Teniendo en cuenta este valor y el que se obtuvo con la proteína sin desglicosilar, se calculó que la AAO tiene un 7,4% de carbohidratos unidos mediante enlace *N*-glicosídico.

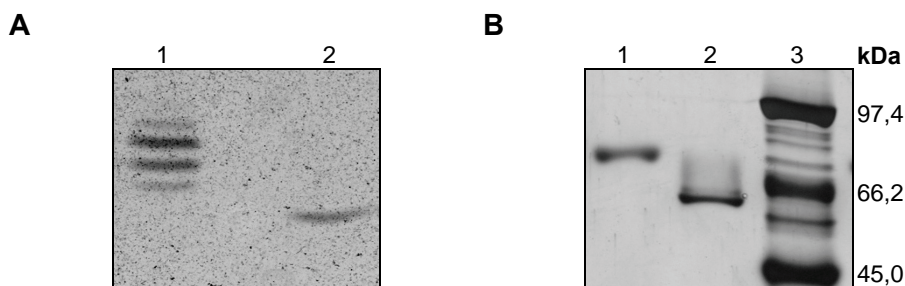


Fig. 3.18. Geles para determinar el punto isoeléctrico (A) y el grado de glicosilación (B) de la AAO del anamorfo de *B. adusta*. Gel de isoelectroenfoque y de SDS-PAGE revelado con Coomassie R-250 y con Ag, respectivamente. Muestras: 1, AAO sin desglicosilar; 2, AAO desglicosilada; y 3, marcadores de masa molecular.

3.3.2.4. Actividad y estabilidad a diferentes valores de pH y de temperatura

En la **Fig. 3.19A** se muestra la actividad de la AAO sobre los alcoholes veratrílico y vainillílico en función del pH, a 24 °C. Utilizando ambos sustratos, la AAO presentó una actividad relativa elevada (> 50%) en el rango de pH 4,0-8,0 con un máximo a pH 6,0. En el **Apartado 3.3.4.1.3** se describe el efecto del pH en las constantes cinéticas de estado estacionario. La **Fig. 3.19C** refleja la estabilidad de la AAO a diferentes valores de pH, a 24 °C. Después de 24 h de incubación, la actividad sobre veratrílico fue estable en el rango de pH 4,0-6,0, mientras que a pH 7,0 sólo se conservó un 27% de la actividad. En condiciones más ácidas o básicas, la actividad se redujo drásticamente durante la primera hora de incubación.

En cuanto a la temperatura, la AAO fue activa en el rango de 15 a 50 °C a pH 6,0 y presentó la actividad más elevada a 45 °C (**Fig. 3.19B**). En las mismas condiciones de pH, la enzima fue estable a 25 °C después de 24 h y conservó el 40% de actividad tras 24 h a 37 °C o 4 h a 40 °C. Sin embargo, la AAO se inactivó rápidamente a valores superiores de temperatura (**Fig. 3.19D**).

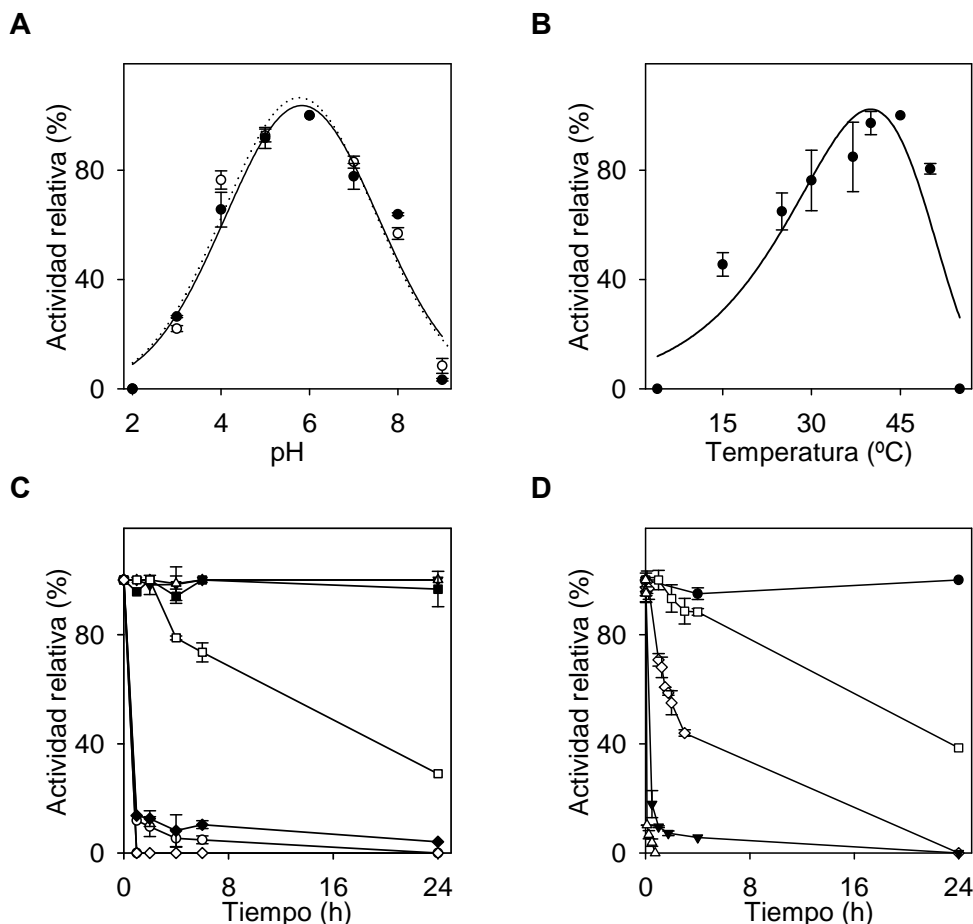


Fig. 3.19. Efecto del pH (A, C) y de la temperatura (B, D) en la actividad y la estabilidad de la AAO del anamorfo de *B. adusta*. **A)** pH óptimo para la oxidación de veratrílico 10 mM (—●—) y vainillílico 1,5 mM (---○---). **B)** Temperatura óptima para oxidar veratrílico 10 mM. **C)** Estabilidad a pH 2,0 (●), 3,0 (○), 4,0 (▼), 5,0 (△), 6,0 (■), 7,0 (□), 8,0 (◆) y 9,0 (◇). **D)** Estabilidad a 25 (●), 37 (□), 40 (◇), 45 (▼) y 50 (△) °C de temperatura.

3.3.2.5. Secuencia aminoacídica del N-terminal

Se determinaron 21 aminoácidos del extremo N-terminal de la AAO mediante degradación de Edman. Esta secuencia (5'ATFFTDASQLPATVYDFIVVG3')

incluye los primeros residuos del dominio de unión al ADP (**Apartado 3.4.4.1.2**).

3.3.3. Características espectroscópicas

Durante la reacción de las flavoenzimas con diferentes compuestos (p. ej., sustratos, inhibidores, sulfito) la monitorización de los cambios espectrales de su cofactor es clave porque permite inferir propiedades de su mecanismo catalítico. Por este motivo, se han realizado varios ensayos relacionados con las características espectroscópicas de la AAO del anamorfo de *B. adusta* que se incluyen en los siguientes apartados.

3.3.3.1. Espectro de absorción y coeficiente de extinción molar

La AAO del anamorfo de *B. adusta* presentó el espectro de absorción característico de las flavoenzimas en su estado oxidado, con máximos a 392 y 463 nm y una relación A_{280}/A_{465} próxima a 10 (**Fig. 3.20**). Al desnaturalizar la AAO mediante tratamiento térmico (80 °C, 5 min), la apoproteína precipitó y en la solución se detectaron los máximos de absorbancia característicos del cofactor (374 y 450 nm). Esto indica inequívocamente que la unión del FAD a la apoproteína es de tipo no covalente. Los valores de absorbancia de los máximos a 463 y 450 nm (de la AAO nativa y de su FAD, respectivamente) sirvieron para determinar un ϵ_{463} de la AAO de $10932 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ utilizando la **Ecuación 2.1**.

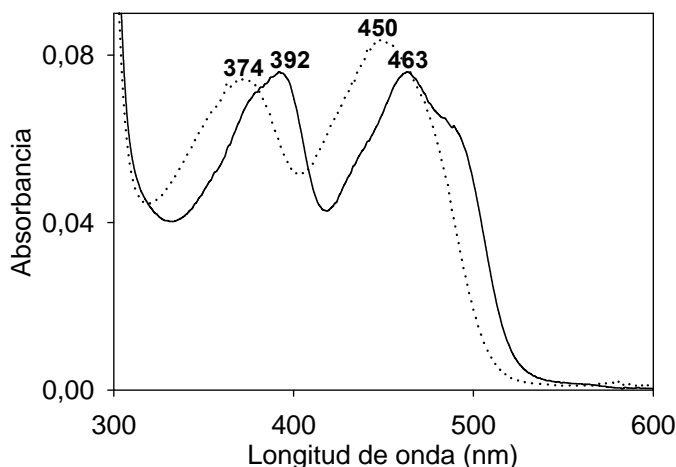


Fig. 3.20. Espectro de absorción de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (—) y de su FAD liberado por desnaturalización térmica (---). Se utilizó una solución de AAO $7,3 \mu\text{M}$ en tampón fosfato sódico 10 mM pH 6,0.

3.3.3.2. Reducción anaeróbica con alcoholes bencílicos

El espectro de absorción de la AAO fue monitorizado durante su reducción con concentraciones crecientes de *p*-anisílico y vainillílico en anaerobiosis (**Fig. 3.21**). Se produjo la reducción directa del FAD con dos electrones, lo que se traduce en una disminución de la absorbancia de los dos máximos de absorción de la AAO y, por tanto, la enzima reducida no presenta color amarillo. Esto también implica que se observe un punto isosbéstico en torno a 330 nm (Macheroux, 1999), que en el caso del vainillílico se observa distorsionado por el espectro de absorción de la vainillina formada en el proceso. Tras su reducción completa, la enzima se reoxidó en presencia de O₂ recuperando el espectro característico del estado oxidado.

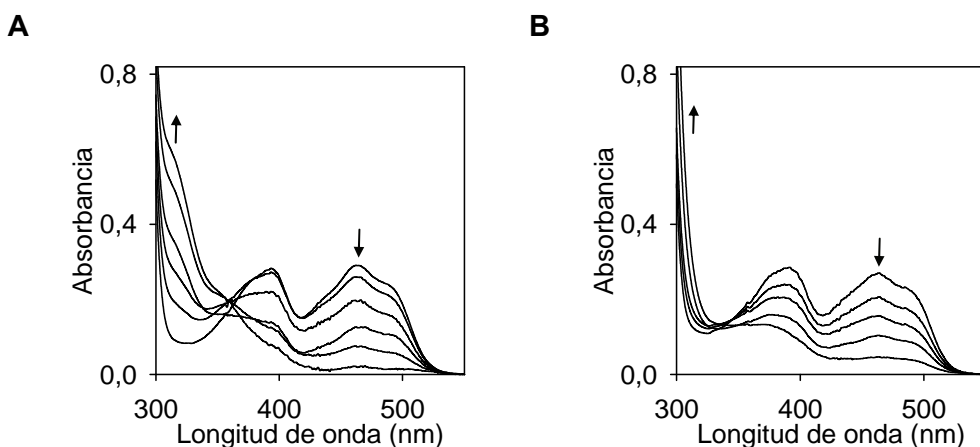


Fig. 3.21. Reducción anaeróbica de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (22 μM) con vainillílico (A) y *p*-anisílico (B). Los espectros fueron registrados con 0, 19, 32, 57, 70 y 77 μM de vainillílico (A) y con 0, 7, 14, 28 y 56 μM de *p*-anisílico (B) en tampón fosfato sódico 10 mM pH 6,0. Las flechas indican el sentido de las variaciones espectrales.

3.3.3.3. Reducción anaeróbica con ditionito sódico

La **Fig. 3.22A** muestra las variaciones en el espectro de absorción de la AAO durante su reducción con concentraciones crecientes de ditionito sódico en condiciones anaeróbicas. No se observaron intermediarios de tipo semiquinona y la enzima se reoxidó tras exponerla a O₂.

3.3.3.4. Reactividad con sulfito sódico

Se evaluó la capacidad del FAD de la AAO de formar un aducto con el ión sulfito. Para ello se monitorizó su espectro de absorción a concentraciones crecientes de sulfito sódico. Fue necesario alcanzar la concentración 0,7 M para

observar las primeras variaciones del espectro de absorción y con 1,7 M se registró un espectro similar al de la enzima reducida (**Fig. 3.22B**).

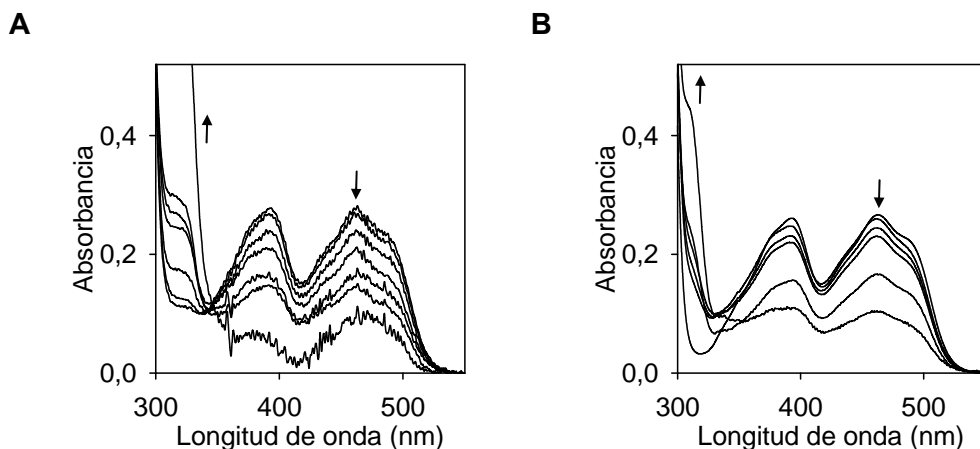


Fig. 3.22. Reducción anaeróbica con ditionito sódico (A) y reacción con sulfito sódico (B) de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (22 μ M). Los espectros fueron registrados con 0, 10, 31, 50, 59, 69 y 97 mM de ditionito sódico (A) y con 0, 0,7, 0,8, 1,0, 1,4 y 1,7 M de sulfito sódico (B) en tampón fosfato sódico 10 mM pH 6,0. Las flechas indican el sentido de las variaciones espectrales.

3.3.4. Características cinéticas

3.3.4.1. Oxidación de alcoholes y fenoles

3.3.4.1.1. Constantes cinéticas de estado estacionario

Se testaron como sustratos de la AAO varios alcoholes bencílicos y cinamílicos y los alifáticos metanol y 2,4-hexadien-1-ol. La AAO oxidó todos los compuestos, a excepción del metanol (**Tabla 3.2**).

Monitorizando la formación de los correspondientes aldehídos, se calculó una k_{cat}/K_m para la oxidación del 3-cloro-*p*-anisílico > *m*-clorobencílico > *p*-anisílico > *p*-clorobencílico > *m*-anisílico > cinamílico > *p*-metilbencílico > 2,4-hexadien-1-ol, con valores superiores a 180 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$. En el caso de los dos primeros, los elevados valores de k_{cat}/K_m obtenidos ($\sim 1000 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$) se deben a la elevada afinidad que presenta la AAO por estos sustratos. Todos ellos se incluyen entre los que la AAO oxidó con valores más elevados de k_{cat} ($> 20 \text{ s}^{-1}$), en el siguiente orden: *p*-anisílico > 2,4-hexadien-1-ol > 3-cloro-*p*-anisílico > *m*-anisílico > *p*-metilbencílico > *p*-clorobencílico > *m*-clorobencílico > cinamílico. También se obtuvieron valores altos de k_{cat} con los alcoholes isovainillílico, *p*-hidroxibencílico, veratrílico y vainillílico ($\sim 40\text{-}60 \text{ s}^{-1}$), aunque la AAO presentó

la afinidad más baja ($K_m \sim 1100\text{--}7000 \mu\text{M}$) por estos cuatro compuestos y por el coniferílico. Los valores de k_{cat} obtenidos con los alcoholes bencílicos metoxilados fueron hasta 20 veces más elevados que con el bencílico, mientras que fue reducido o nulo el efecto positivo de los sustituyentes halogenados (cloro y fluor) en este parámetro cinético. En cuanto al alcohol alifático poliinsaturado 2,4-hexadien-1-ol, los valores de k_{cat}/K_m y de k_{cat} fueron 10 y 16 veces mayores que con el bencílico, respectivamente. Utilizando los alcoholes fenólicos se calcularon valores de k_{cat} hasta 9 veces mayores que con el bencílico.

Además de monitorizar la producción de aldehído, se valoró la producción de H_2O_2 durante la oxidación de la mayoría de los alcoholes mencionados anteriormente (utilizando un ensayo acoplado con HRP y *o*-dianisidina). En la mayoría de los casos, los valores obtenidos por ambos métodos fueron similares (Tabla 3.2). Sin embargo, se produjo prácticamente el doble de H_2O_2 que de aldehído utilizando el *p*-fluorobencílico como sustrato y también se detectó un exceso significativo de H_2O_2 con el cinamílico y el *p*-clorobencílico. Así, estos 3 alcoholes presentaron una relación entre los valores de k_{cat} determinados en base a la producción de H_2O_2 y de aldehído de 1,7, 1,5 y 1,4, respectivamente.

Tabla 3.2. Constantes cinéticas de la AAO con diferentes alcoholes como sustratos, determinadas monitorizando la producción de aldehído y de H_2O_2 .

Alcoholes	$K_m (\mu\text{M})$		$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$		$k_{\text{cat}}/K_m (\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1})$	
	Aldehído	H_2O_2	Aldehído	H_2O_2	Aldehído	H_2O_2
(A) Aromáticos no fenólicos						
Bencílico	329 ± 15	319 ± 31	$6 \pm 0,1$	$7 \pm 0,2$	18 ± 1	21 ± 2
<i>m</i> -Anisílico	156 ± 5	127 ± 4	$54 \pm 0,4$	$62 \pm 0,4$	349 ± 8	491 ± 13
<i>p</i> -Anisílico	187 ± 16	162 ± 6	121 ± 2	147 ± 1	646 ± 45	910 ± 28
<i>p</i> -Metilbencílico	147 ± 4	n. d.	$41 \pm 0,3$	n. d.	278 ± 6	n. d.
Veratrílico	2094 ± 114	2140 ± 159	47 ± 1	57 ± 1	22 ± 1	27 ± 2
<i>m</i> -Clorobencílico	23 ± 1	23 ± 1	$24 \pm 0,2$	$25 \pm 0,2$	1052 ± 29	1074 ± 33
<i>p</i> -Clorobencílico	71 ± 4	92 ± 3	$26 \pm 0,3$	$37 \pm 0,3$	361 ± 15	400 ± 11
3-Cloro- <i>p</i> -anisílico	49 ± 4	32 ± 4	73 ± 2	84 ± 2	1480 ± 114	2671 ± 270
<i>m</i> -Fluorobencílico	208 ± 11	305 ± 9	$10 \pm 0,1$	$13 \pm 0,1$	47 ± 2	41 ± 1
<i>p</i> -Fluorobencílico	408 ± 47	582 ± 15	$9 \pm 0,3$	$15 \pm 0,1$	22 ± 2	$25 \pm 0,5$
Cinamílico	73 ± 3	91 ± 2	$22 \pm 0,3$	$33 \pm 0,3$	305 ± 11	363 ± 7
(B) Aromáticos fenólicos						
<i>p</i> -Hidroxibencílico	6944 ± 495	n. d.	48 ± 2	n. d.	$7 \pm 0,3$	n. d.
Isovainilílico	1115 ± 35	n. d.	56 ± 1	n. d.	51 ± 1	n. d.
Vainilílico	1404 ± 77	n. d.	44 ± 1	n. d.	31 ± 1	n. d.
Coniferílico	1860 ± 124	n. d.	$9 \pm 0,3$	n. d.	$5 \pm 0,2$	n. d.
(C) Alifáticos						
2,4-Hexadien-1-ol	521 ± 27	508 ± 15	97 ± 2	115 ± 1	186 ± 7	227 ± 5

Se utilizó tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0. Los datos experimentales se ajustaron a la función hiperbólica de Michaelis-Menten. N. d., no determinado.

3.3.4.1.2. Influencia de la estructura de los sustratos en las constantes cinéticas

Se realizaron análisis de QSAR con objeto de correlacionar los valores de las constantes cinéticas de la AAO con la estructura química de los sustratos. Concretamente, se estudió la influencia de las propiedades electrónicas, estéricas e hidrofóbicas de los sustituyentes (localizados en el anillo aromático de los compuestos oxidados) en los valores de K_m y de k_{cat} . Para estos análisis, se utilizaron diferentes derivados monosustituídos del alcohol bencílico como sustratos. Se analizaron separadamente los compuestos sustituidos en la posición *meta* y en la *para* del anillo bencénico, utilizando los valores de las constantes cinéticas obtenidos monitorizando la producción de aldehído. En el caso del alcohol *p*-anisílico, se utilizaron los valores calculados a diferentes concentraciones de alcohol y de O_2 (**Tabla 3.5**). Para el resto de los alcoholes, se utilizaron los valores obtenidos a concentración atmosférica de O_2 (**Tabla 3.2**), puesto que sus valores de K_m^B son muy bajos (**Tabla 3.5**). Los análisis estadísticos de las correlaciones entre los valores de las constantes cinéticas y los diferentes parámetros fisicoquímicos se incluyen en la **Tabla 3.3**.

Los resultados obtenidos indican que los valores de K_m dependen de los valores del parámetro hidrofóbico π de los sustituyentes, tanto si éstos se sitúan en la posición *meta* como en la *para* del anillo bencénico ($R = 0,9$ y $1,0$ y $a = -1,4$ and $-1,3$, respectivamente) (**Fig. 3.23A y B**). En el caso de los alcoholes *meta*-sustituídos, la constante de afinidad también depende del parámetro estérico E_s ($R = 0,9$ y $b = 1,2$). Al analizar π y E_s conjuntamente, el valor de R aumenta pero el de F disminuye.

Con los alcoholes *para*-sustituídos, se observó una correlación lineal de los valores de k_{cat} con el parámetro electrónico σ_p^+ y también con el estérico MR ($R = 0,7$ y $0,9$, respectivamente). A pesar de que la magnitud de la pendiente es reducida en el caso de MR ($b = 0,2$), al realizar un análisis conjunto de σ_p^+ y MR, mejoran considerablemente los parámetros estadísticos de la correlación ($R = 1$, $F = 92,0$ y $P = 0,002$). Además, la correlación entre los valores de k_{cat} y σ_p^+ presenta un ajuste mejor si se corrige el efecto de MR (**Fig. 3.23D**). Estos resultados indican que elevados valores de MR y la presencia de sustituyentes dadores de electrones, en la posición *para*, incrementan la velocidad de reducción del FAD. En cuanto a los valores de k_{cat} con los alcoholes bencílicos *meta*-sustituídos, se observó la dependencia más significativa con MR ($R = 1$ y $b = 0,1$) (**Fig. 3.23C**).

Tabla 3.3. Efecto de la estructura química de los sustratos en los valores de k_{cat} y K_m de la AAO del anamorfo de *B. adusta*.

Constante cinética	Parámetro fisicoquímico ¹	Pendiente	Término independiente	R^2	F^3	P^4
(A) Sustituidos en posición meta						
k_{cat}	F	$0,9 \pm 1,4$	$1,0 \pm 0,5$	0,4	0,4	0,6
	π	$0,2 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,3$	0,2	0,1	0,8
	E_s	$-0,7 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,3$	0,7	1,5	0,3
	MR	$0,1 \pm 0,02$	$0,8 \pm 0,1$	1,0	26,2	0,04
	MR + F	$0,1 \pm 0,03$	$0,7 \pm 0,2$	1,0	10,7	0,2
		$0,4 \pm 0,5$				
K_m	F	$-1,5 \pm 1,5$	$2,6 \pm 0,5$	0,6	1,02	0,4
	π	$-1,4 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,1$	0,9	16,6	0,1
	E_s	$1,2 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,2$	0,9	11,4	0,1
	MR	$-0,1 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,4$	0,6	0,9	0,4
	$\pi + E_s$	$-0,9 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,2$	1,0	13,5	0,2
		$0,6 \pm 0,4$				
(B) Sustituidos en posición para						
k_{cat}	σ^+_p	$-1,0 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,2$	0,7	5,0	0,1
	σ^-_p	$-1,7 \pm 1,2$	$1,3 \pm 0,3$	0,6	2,0	0,2
	F	$0,3 \pm 1,4$	$1,4 \pm 0,4$	0,1	0,03	0,9
	π	$-0,2 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,3$	0,1	0,1	0,8
	E_s	$-0,5 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,5$	0,4	0,7	0,4
	MR	$0,2 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,3$	0,9	10,8	0,03
	MR + σ^+_p	$0,1 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,1$	1,0	92,0	0,002
		$-0,7 \pm 0,1$				
	σ^+_p - MR	$-0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,04$	1,0	70,3	0,001
	MR + σ^-_p	$0,2 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,1$	1,0	34,8	0,008
		$-1,4 \pm 0,3$				
K_m	σ^+_p	$-1,2 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,3$	0,7	4,7	0,1
	σ^-_p	$-2,6 \pm 1,1$	$2,3 \pm 0,2$	0,8	5,7	0,1
	F	$0,6 \pm 1,6$	$2,5 \pm 0,5$	0,2	0,1	0,8
	π	$-1,3 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,1$	1,0	47,7	0,002
	E_s	$0,6 \pm 0,7$	$3,0 \pm 0,5$	0,4	0,7	0,5
	MR	$-0,1 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,5$	0,4	0,6	0,5
	$\pi + \sigma^-_p$	$-1,2 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,1$	1,0	19,6	0,02
		$-0,4 \pm 0,8$				

¹Los valores de los parámetros fisicoquímicos fueron obtenidos de Hansch y Leo (1979). Se utilizaron 4 y 6 sustituyentes diferentes en el caso de los alcoholes *meta*- y *para*-sustituidos, respectivamente.

² R es el coeficiente de correlación, si $R = 0$ los valores de la variable independiente no predicen los de la dependiente y si $R = 1$ hay predicción perfecta entre estas variables.

³ F es el cociente entre la variación con respecto a la media de la variable dependiente y la variación con respecto a la línea de regresión. Elevados valores de F indican que las diferencias encontradas en función de la variable independiente son significativas.

⁴ P es la probabilidad de estar equivocado en concluir que hay una asociación entre la variable dependiente y la independiente.

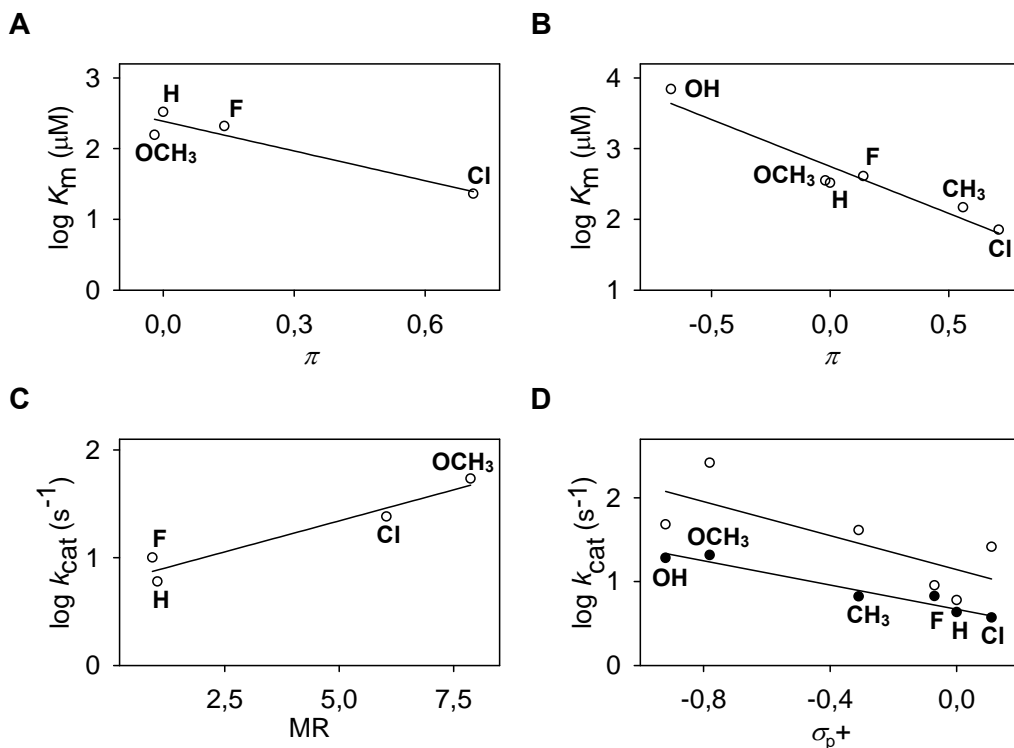


Fig. 3.23. Correlación entre los valores de las constantes cinéticas de la AAO del anamorfo de *B. adusta* y la estructura química de los sustratos. Se analizaron los valores de K_m (A y B) y de k_{cat} (C y D) obtenidos con alcoholes bencílicos monosustituídos en la posición *meta* (A y C) o *para* (B y D) del anillo bencénico. En D se muestra la correlación entre los valores de k_{cat} y σ_p^+ obtenida antes (\circ) y después (\bullet) de restar la contribución de MR utilizando la Ecuación 2.4 y los valores de la Tabla 3.3.

3.3.4.1.3. Efecto del pH en las constantes cinéticas

La influencia del pH en los parámetros cinéticos de la AAO, se determinó utilizando los alcoholes *p*-anisílico y vainillílico como sustratos. Los ensayos se limitaron al rango de pH 2,5-8,5 porque la enzima no es estable a valores más extremos. La Tabla 3.4 incluye los valores de pK_a obtenidos utilizando dos ecuaciones distintas y un análisis estadístico para seleccionar la más adecuada (ANOVA).

Con ambos sustratos, la k_{cat}/K_m en función del pH presenta una curva acampanada que implica la presencia de dos grupos ionizables durante la catálisis (Fig. 3.24C). Esto indica que en la reacción catalizada por la AAO, es clave un residuo desprotonado y otro protonado. Se obtuvieron valores de pK_a similares con el *p*-anisílico ($2,2 \pm 0,1$ y $8,7 \pm 0,1$) y con el vainillílico ($2,3 \pm 0,1$ y $8,2 \pm 0,03$). En cuanto a la K_m (Fig. 3.24A), con el vainillílico ninguna de las

dos ecuaciones describe los datos experimentales obtenidos y con el *p*-anisílico la curva de pendientes 0 y -1 se ajusta mejor que la de pendientes +1, 0 y -1 (**Ecuación 2.6** y **2.5**, respectivamente). En base al análisis estadístico, los valores de k_{cat} con el vainillílico y con el *p*-anisílico corresponden a la **Ecuación 2.5** y **2.6**, respectivamente. Sin embargo, en el caso del *p*-anisílico también es adecuada la **Ecuación 2.5** (**Fig. 3.24B**).

Tabla 3.4. Análisis estadístico de los valores de pK_a de la AAO del anamorfo de *B. adusta*.

	Pendiente	pK_{a1}	pK_{a2}	R	F	P
(A) <i>p</i>-Anisílico						
K_m	0, -1	-	$8,4 \pm 0,1$	0,9	35,5	0,001
	+1, 0, -1	$-466168,7 \pm (-inf)$	$8,4 \pm (+inf)$	0,9	14,8	0,008
k_{cat}	0, -1	-	$8,1 \pm 0,1$	1,0	92,9	< 0,0001
	+1, 0, -1	$1,7 \pm 0,4$	$8,1 \pm 0,1$	1,0	47,9	0,001
k_{cat}/K_m	0, -1	-	$8,8 \pm 0,2$	0,7	7,01	0,04
	+1, 0, -1	$2,2 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,1$	1,0	52,9	0,0004
(B) Vainillílico						
K_m	0, -1	-	$10,1 \pm 2,8$	0,06	0,02	0,9
	+1, 0, -1	$-16,5 \pm (-inf)$	$10,1 \pm (+inf)$	0,06	0,01	1,0
k_{cat}	0, -1	-	$8,2 \pm 0,1$	0,9	40,6	0,001
	+1, 0, -1	$2,1 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,1$	1,0	49,9	0,001
k_{cat}/K_m	0, -1	-	$8,3 \pm 0,1$	0,9	24,8	0,003
	+1, 0, -1	$2,3 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,03$	1,0	316,7	< 0,0001

Los datos experimentales se ajustaron a la **Ecuación 2.5** y **2.6**.

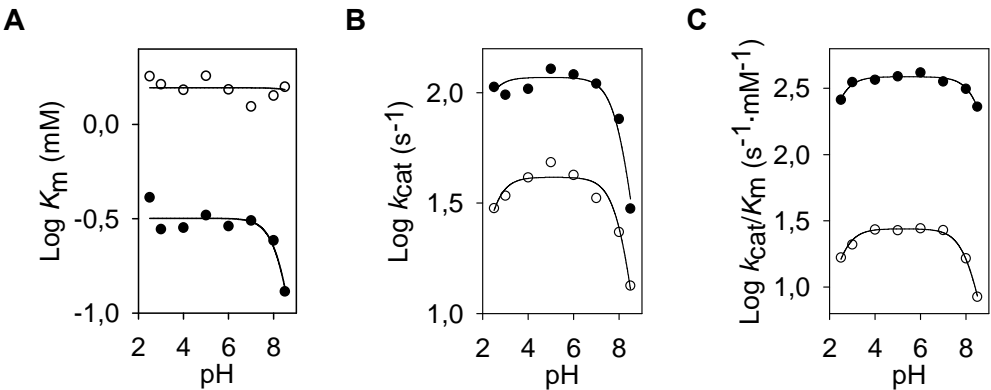


Fig. 3.24. Efecto del pH en la K_m (A), k_{cat} (B), y k_{cat}/K_m (C) de la AAO, utilizando como sustrato *p*-anisílico (●) o vainillílico (○). Se utilizó la **Ecuación 2.6** (A) o **2.5** (B y C).

3.3.4.1.4. Mecanismo cinético: secuencial o ping-pong

Se determinó el mecanismo cinético de la AAO utilizando diferentes alcoholes bencílicos como sustratos reductores (**Tabla 3.5**). Para ello, se calcularon las

velocidades iniciales (por producción de aldehído) a diferentes concentraciones del alcohol y de O₂. En el caso del *p*-anisílico, la representación de $1/v$ (s) en función de $1/c$ (mM⁻¹), consiste en varias líneas que convergen a la izquierda del eje de ordenadas (**Fig. 3.25A**). Este resultado es característico del mecanismo secuencial, que consiste en que el aldehído no se libera del centro activo de la AAO hasta su reoxidación. Sin embargo, con los demás alcoholes utilizados (vainillílico, *m*-fluorobencílico y *m*-clorobencílico) la reacción se lleva a cabo mediante un mecanismo cinético de tipo *ping-pong*, puesto que se obtuvieron líneas paralelas en las correspondientes representaciones de dobles-recíprocos (**Fig. 3.25B, C y D**). Este mecanismo implica que los dos productos de la reacción se liberan independientemente sin la formación de un complejo ternario.

Tabla 3.5. Constantes cinéticas de la AAO obtenidas mediante cinéticas bi-sustrato.

	<i>p</i> -Anisílico	Vainillílico	<i>m</i> -Fluorobencílico	<i>m</i> -Clorobencílico
Mecanismo	Ternario	<i>Ping-pong</i>	<i>Ping-pong</i>	<i>Ping-pong</i>
k_{cat} (s ⁻¹)	261 ± 7	43 ± 1	9 ± 0,1	29 ± 0,2
K_m^A (μM)	353 ± 22	1408 ± 50	179 ± 6	22 ± 1
k_{cat}/K_m^A (s ⁻¹ ·mM ⁻¹)	740 ± 51	30 ± 1	51 ± 2	1349 ± 36
K_m^B (μM)	153 ± 14	35 ± 2	11 ± 1	12 ± 1
k_{cat}/K_m^B (s ⁻¹ ·mM ⁻¹)	1705 ± 158	1214 ± 73	801 ± 82	2436 ± 176
K^A (μM)	63 ± 35	-	-	-

Se utilizó tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0 y las **Ecuaciones 2.7 y 2.8**.

3.3.4.2. Oxidación de aldehídos aromáticos

La AAO catalizó la oxidación de la mayoría de los aldehídos aromáticos testados a sus correspondientes ácidos (**Fig. 3.26**). La **Tabla 3.6** incluye las constantes cinéticas de estado estacionario con los que fueron mejores sustratos. Se calcularon a partir del H₂O₂ liberada mediante ensayos acoplados con la HRP. La AAO presentó una eficiencia catalítica con *m*-clorobenzaldehído > *m*-fluorobenzaldehído > 3-cloro-*p*-anisaldehído > *p*-nitrobenzaldehído, con valores de hasta 1 s⁻¹·mM⁻¹. Esta baja eficiencia de la AAO con los aldehídos se debe a los reducidos valores de constante catalítica obtenidos (k_{cat} 0,002-0,2 s⁻¹), puesto que la afinidad de la AAO por los aldehídos es del mismo orden ($K_m \sim 50$ -400 μM) que en el caso de los alcoholes (**Tabla 3.2**). No se detectó oxidación de vainillina y la velocidad de oxidación de *p*-anisaldehído y de cinamaldehído fue muy reducida.

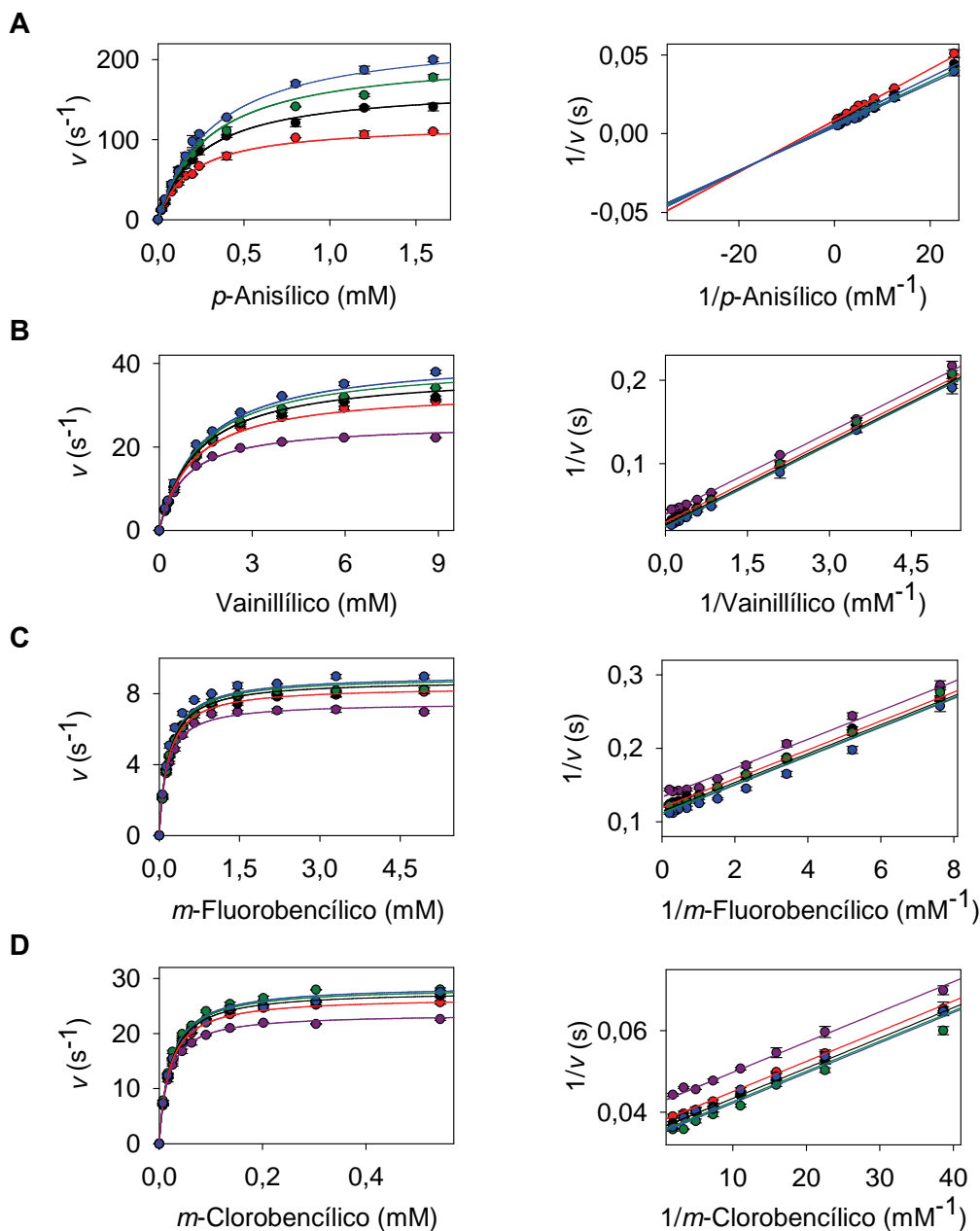


Fig. 3.25. Velocidad de oxidación de la AAO a varias concentraciones del sustrato reductor (diferentes alcoholes) y del sustrato oxidante (O_2). Se incluyen los dobles-recíprocos característicos del mecanismo ternario (A) y del *ping-pong* (B, C y D). Se utilizó el *p*-anisílico (A), vainillílico (B), *m*-fluorobencílico (C) y *m*-clorobencílico (D) con concentraciones de O_2 de 0,052 (●), 0,13 (●), 0,273 (●), 0,572 (●) y 1,3 (●) mM.

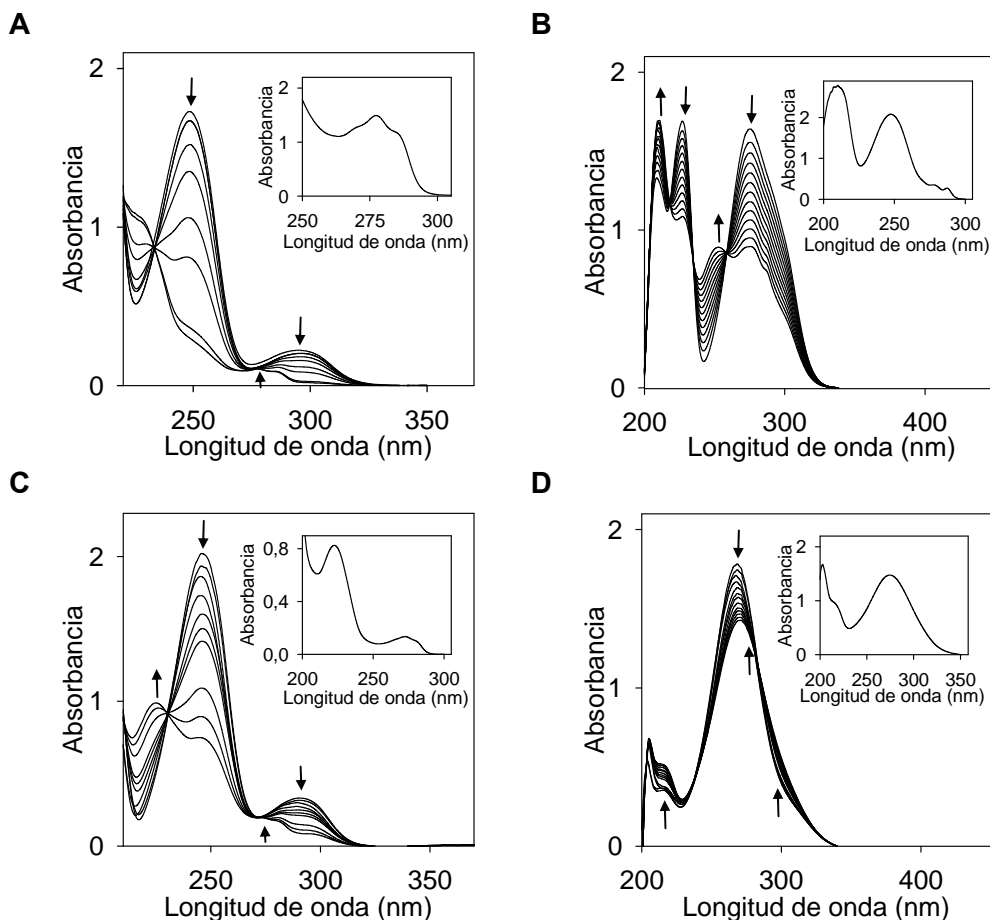


Fig. 3.26. Oxidación del *m*-clorobenzaldehído 0,3 mM (A), 3-cloro-*p*-anisaldehído 0,1 mM (B), *m*-fluorobenzaldehído 0,2 mM (C) y *p*-nitrobenzaldehído 0,1 mM (D) con 0,5 μ M de la AAO. Se utilizó tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0. Los espectros se registraron a los 0, 1, 5, 10, 20, 30, 60 y 120 min (A), cada 2 h durante 24 h (B), a los 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 24 h (C) o cada 4 h durante 48 h (D). Se muestra, insertado en la parte superior de cada figura, el espectro de absorción del patrón utilizado para identificar el producto de la reacción (*m*-clorobenzoico 2,5 mM, 3-cloro-*p*-anisico 0,2 mM, *m*-fluorobenzoico 0,1 mM y *p*-nitrobenzoico 0,2 mM). Las flechas indican el sentido de los cambios espectrales.

Tabla 3.6. Constantes cinéticas de la AAO con diferentes aldehídos.

Aldehídos	K_m (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)
<i>m</i> -Clorobenzaldehído	176 ± 14	$0,232 \pm 0,005$	$1,319 \pm 0,087$
3-Cloro- <i>p</i> -anisaldehído	48 ± 3	$0,002 \pm 0,00003$	$0,049 \pm 0,002$
<i>m</i> -Fluorobenzaldehído	258 ± 15	$0,014 \pm 0,0002$	$0,054 \pm 0,002$
<i>p</i> -Nitrobenzaldehído	380 ± 22	$0,004 \pm 0,0001$	$0,011 \pm 0,001$

Se utilizó tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0. Los datos experimentales se ajustaron a la función hipérbolica de Michaelis-Menten.

3.3.4.3. Reacciones de desmetilación, hidroxilación y desaminación

La AAO no catalizó la desmetilación de bencilmetil éter o de *p*-(metoximetil)fenol, la hidroxilación de eugenol, ni la desaminación de *p*-metoxibencilamina. Estos resultados se dedujeron tras incubar la AAO con los compuestos mencionados y no observar variaciones de sus espectros de absorción (pH 6,0 y 7,5). Sin embargo, todos inhibieron la oxidación de alcohol veratrílico según se indica en el siguiente apartado.

3.3.4.4. Estudios de inhibición

Se testaron diferentes compuestos como inhibidores de la oxidación de alcohol veratrílico catalizada por la AAO. La **Fig. 3.27** incluye las correspondientes representaciones de dobles-recíprocos, a diferentes concentraciones del inhibidor.

Todos los compuestos a pH 6,0 resultaron ser inhibidores competitivos, puesto que al aumentar la concentración del inhibidor, disminuyó la afinidad de la AAO por el veratrílico y la velocidad máxima se mantuvo constante. Los valores de K_i obtenidos (0,002-172 mM, **Tabla 3.7**) indicaron que la AAO presenta la afinidad más elevada por el eugenol, mientras que el metanol actúa como inhibidor sólo a concentraciones muy altas.

En el caso de la *p*-metoxibencilamina a pH 8,0, la velocidad máxima disminuyó en presencia del inhibidor y el valor de la K_m no varió. Por tanto, esta amina es un inhibidor no competitivo en condiciones de pH básicas, con una K_i de $5,920 \pm 0,315$ mM.

Tabla 3.7. Constantes de inhibición competitiva de la AAO.

Inhibidor	K_i (mM)
Eugenol	$0,002 \pm 0,0001$
Bencilmetil éter	$0,040 \pm 0,001$
<i>p</i> -(Metoximetil)fenol	$0,137 \pm 0,009$
<i>p</i> -Metoxibencilamina	$8,404 \pm 0,911$
Metanol	$172,105 \pm 26,273$

Se utilizó veratrílico como sustrato y tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0. Los datos experimentales se ajustaron a la **Ecuación 2.9**.

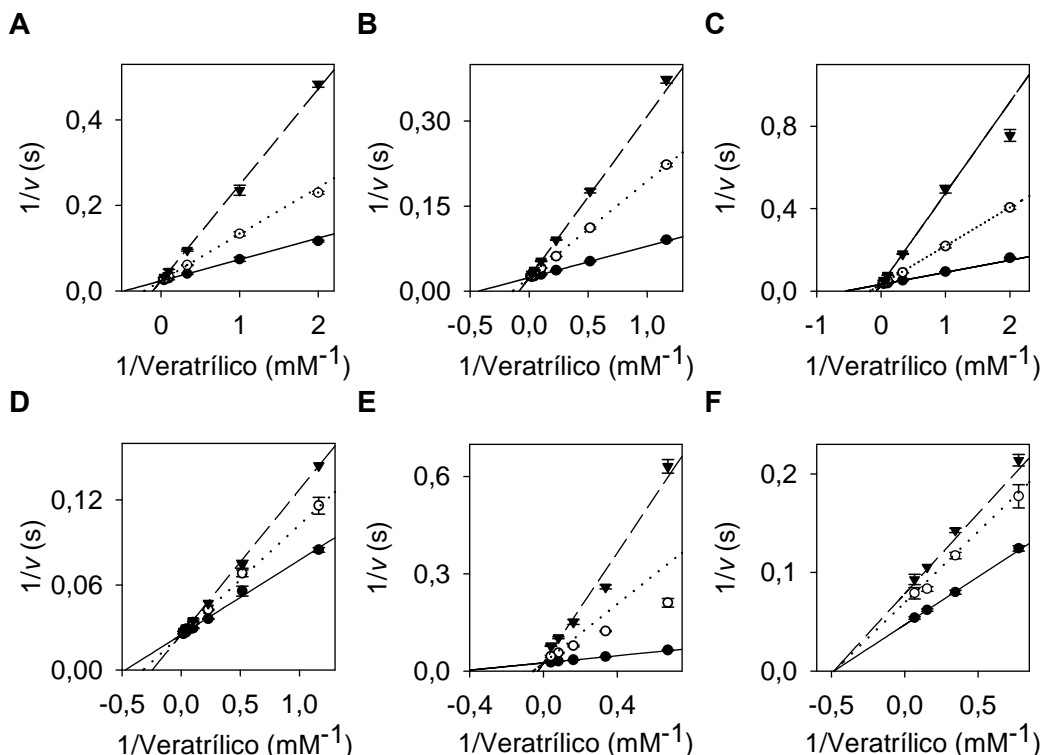


Fig. 3.27. Inhibición competitiva (A, B, C, D y E) y no competitiva (F) de la oxidación de veratrílico catalizada por la AAO. Los inhibidores testados fueron eugenol (2 y 6 μM , A), bencilmetil éter (83 y 166 μM , B), *p*-(metoximetil)fenol (300 y 900 μM , C), *p*-metoxibencilamina a pH 6,0 (4 y 8 mM, D) y a pH 8,0 (3 y 4 mM, F) y metanol (1 y 2 M, E). En la inhibición competitiva el punto de intersección de las líneas se halla sobre el eje de ordenadas y en la no competitiva las líneas convergen en el eje de abscisas. Se utilizó tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0 (A, B, C, D y E) y también pH 8,0 con la amina (F). En todos los casos: ● = sin *I*; ○ = con concentración de *I* inferior; y ▼ = con concentración de *I* superior.

3.4. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y AMINOACÍDICA DE LA AAO DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

Combinando varias técnicas moleculares se llevó a cabo la clonación y secuenciación de gran parte del gen que codifica la AAO. A continuación, se indican los resultados derivados de cada metodología y se analiza esta secuencia en comparación con la de otras oxidorreductasas.

3.4.1. Determinación de la secuencia del extremo 5'

Las primeras 54 pb del extremo 5' se obtuvieron mediante una PCR con ADN genómico y *primers* degenerados (D1 y D2). Éstos se diseñaron en base a los extremos de la secuencia aminoacídica del N-terminal de la AAO purificada. La

Fig. 3.29A muestra el gel de agarosa con los productos de amplificación. Se clonó el fragmento que presentaba la masa molecular esperada y no estaba presente en los controles. Éste incluía en los extremos la secuencia de los *primers* utilizados (40 de las 54 pb, **Fig. 3.28**) y la región interna codificaba los correspondientes aminoácidos del péptido obtenido por degradación de Edman (**Apartado 3.3.2.5**).

Una vez que se dispuso de la secuencia de este primer fragmento, se diseñó un cebador específico de su extremo 3' (SP1) para realizar *genome walking* mediante SSP-PCR. Este método implica tres pasos claves: **i**) digestión del ADN genómico con endonucleasas; **ii**) ligación de los fragmentos de restricción en un vector de clonación; y **iii**) PCR con el *primer* V1 que hibrida en el vector y con un *primer* específico de la AAO. De esta forma se determinaron las siguientes 1309 pb solapando 3 fragmentos consecutivos (**Fig. 3.28**). El primer fragmento presenta la secuencia comprendida entre dos dianas de restricción de la endonucleasa *Hae*III (353 pb). El segundo fragmento fue amplificado con el *primer* SP2 (específico del primer fragmento) y finaliza en el sitio de restricción de *Hpy*CH4III (343 pb). Para el tercero, se utilizó SP3 (específico del segundo fragmento) y la enzima *Eco*RV (691 pb). La **Fig. 3.29B, C y D** muestra los geles de agarosa con las correspondientes bandas antes de su extracción, clonación y secuenciación.

Paralelamente a la obtención del último fragmento mediante SSP-PCR, se utilizó otra técnica que permitió determinar las 262 pb adyacentes al sitio de restricción de *Eco*RV. El proceso consistió en una PCR convencional con ADN genómico en la que se utilizó el *primer* SP2 y el *primer* degenerado D3. Éste se diseñó en base a una región conservada en la familia GMC de oxidorreductasas (motivo adyacente al extremo C-terminal, **Apartado 3.4.4.1.2**). El fragmento amplificado presentaba 1239 pb (**Fig. 3.29E**), de las que 977 habían sido determinadas previamente por SSP-PCR. El tamaño del fragmento indicaba que D3 había hibridado desde el nucleótido 1582, mientras que en la AAO de *P. eryngii* se complementaría a partir del 2187 (Varela *et al.*, 1999). Esto sugería que D3 se había unido a una región anterior a la correspondiente secuencia conservada. Sin embargo, el extremo 5' de las dos hebras del fragmento amplificado coincidía con la secuencia de SP2. Por tanto, ambas hebras se habían amplificado con el mismo *primer*, probablemente debido a la baja temperatura de hibridación utilizada (T_h y T_m de 49 y 60 °C, respectivamente) y al elevado grado de degeneración de D3. Posteriormente, se confirmó (clonando el mismo fragmento mediante otra técnica, **Apartado 3.4.2**) que la región de la AAO donde hibridó inespecíficamente SP2 presentaba 10 nucleótidos complementarios de este *primer*.

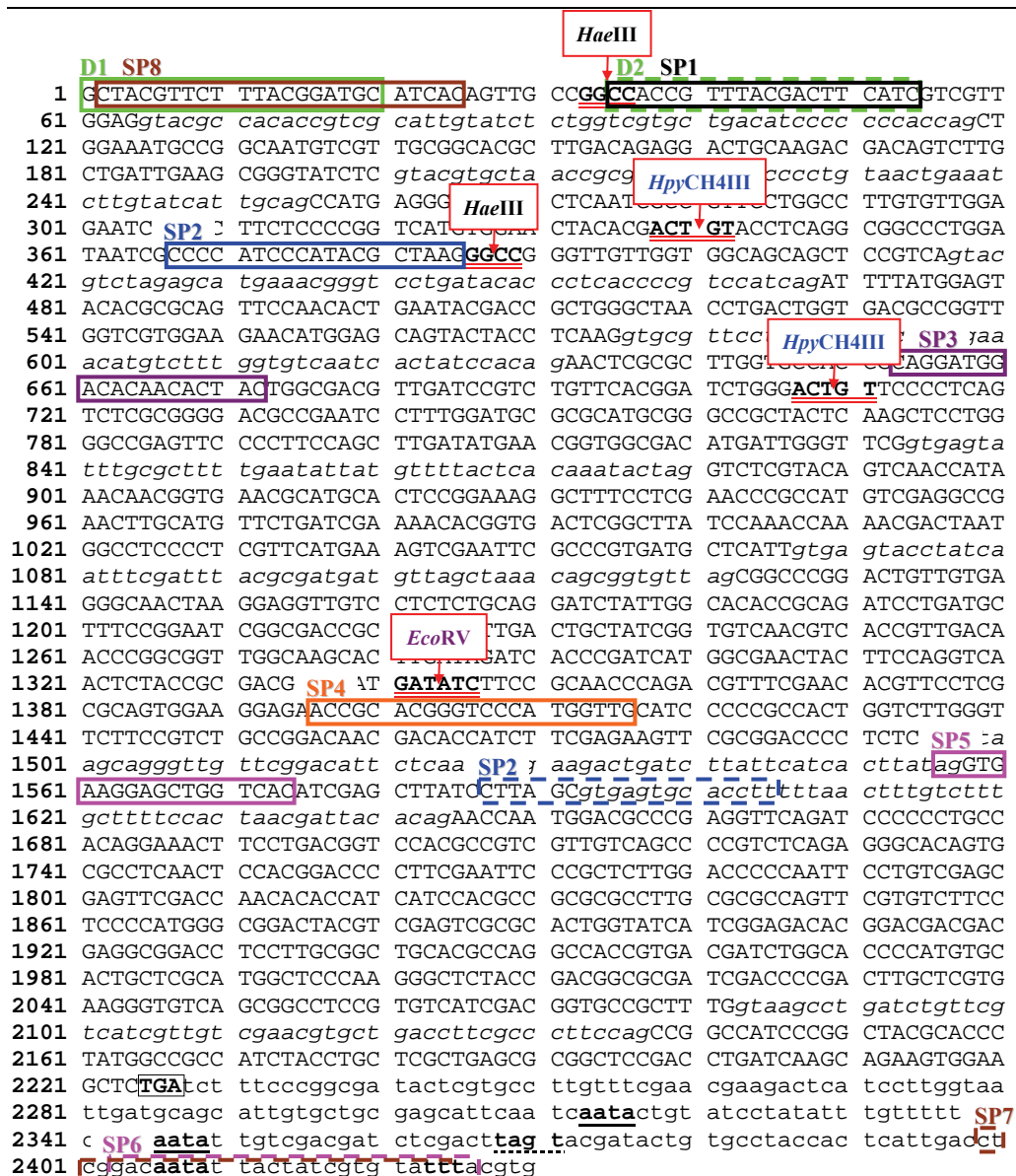


Fig. 3.28. Secuencia nucleotídica del gen de la AAO. Se indican las secuencias de los cebadores (SP1-SP8) y de las dianas de las enzimas de restricción (*HaeIII*, *HpyCH4III* y *EcoRV*) que se utilizaron para clonar este gen. Las parejas de cebadores se recuadran en el mismo color. Cuando la secuencia recuadrada coincide con la secuencia del cebador se utiliza línea continua y si la secuencia recuadrada corresponde a la secuencia inversa complementaria del cebador se utiliza línea discontinua. Las dianas de restricción se destacan en negrita y se subrayan en rojo con línea doble. Los intrones se indican en letra minúscula y cursiva. El codón de terminación se destaca en negrita y se recuadra y a continuación se muestra en minúscula la región no traducida 3' (*untranslated region*, 3'-UTR). En la 3'-UTR se subrayan con línea continua 3 señales de poliadenilación hipotéticas y con línea discontinua dos secuencias conservadas en levaduras.

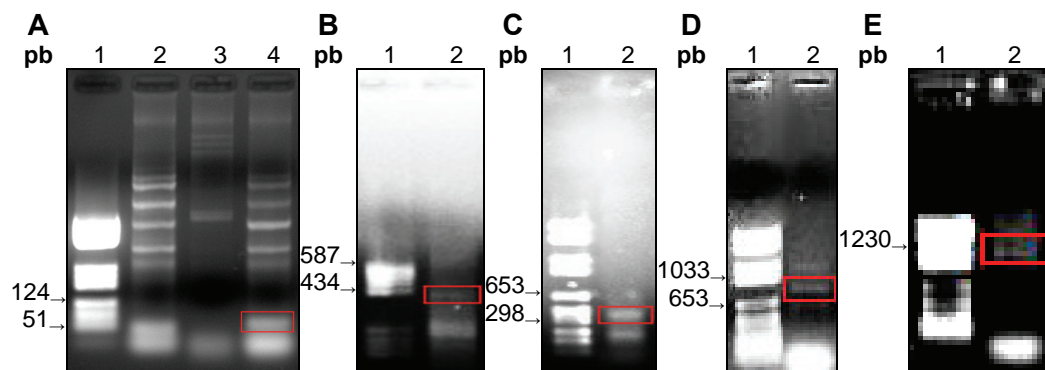


Fig. 3.29. Geles de agarosa con diferentes fragmentos del gen de la AAO (banda recuadrada) amplificados por PCR (A, E) y por SSP-PCR (B, C y D). Los geles A y B se prepararon al 2% y tienen el *DNA molecular weight marker* V y los geles C-E son al 0,8% y tienen el VI (pocillo 1). **A)** Se amplificaron las primeras 54 pb del extremo 5' con ADN genómico y los *primers* D1 y D2 (pocillo 4). Controles en ausencia de uno de los *primers*: sin D2 (pocillo 2) y sin D1 (pocillo 3). **B, C y D)** PCR con los productos de restricción de ADN genómico, el *primer* V1 y un *primer* específico. Endonucleasas y *primers*: **B)** *Hae*III y SP1; **C)** *Hpy*CH4III y SP2; y **D)** *Eco*RV y SP3. **E)** PCR con ADN genómico y SP2 (hibridó en ambas hebras).

3.4.2. Determinación de la secuencia del extremo 3'

La secuencia del extremo 3' del gen que codifica la AAO se determinó mediante la técnica RACE. El ARN_m se extrajo de cultivos con actividad AAO y se realizó su retrotranscripción con un cebador poli-T (dT-*anchor*). A continuación, el ADN_c sintetizado se amplificó con el cebador *Anchor* y un cebador específico de la secuencia obtenida previamente por PCR (SP4, **Fig. 3.28**). Se clonó un fragmento de 883 pb (**Fig. 3.30A**) que incluía en su extremo 5' 137 pb de secuencia conocida y en el 3' la cola de poli-A (16 A).

Finalmente, los intrones en este fragmento se determinaron mediante una PCR convencional con cebadores específicos de ambos extremos (SP5 y SP6). Como molde de esta reacción se utilizaron los productos de amplificación de una PCR realizada previamente con ADN genómico, una *T_h* inferior y los mismos cebadores (**Fig. 3.30B y C**).

3.4.3. Análisis de la secuencia nucleotídica

Se determinaron 2430 pb del gen que codifica la AAO solapando los fragmentos obtenidos como se indica en los apartados anteriores. A continuación, se realizó una RT-PCR con cebadores específicos de ambos extremos (SP7 y SP8, **Fig. 3.30D**) para determinar el marco abierto de lectura (*open reading frame*, ORF). Las 2430 pb secuenciadas incluyen la región codificante de la proteína madura,

los intrones y la 3'-UTR (no contienen la 5'-UTR, ni el péptido señal). En los siguientes apartados se analizan diferentes aspectos de estas regiones.

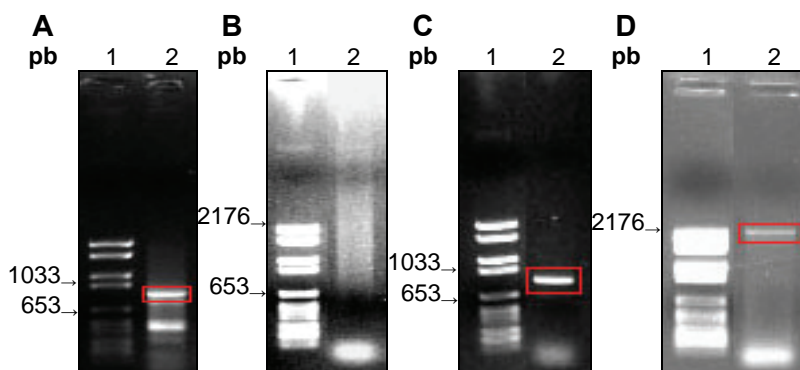


Fig. 3.30. Gels de agarosa con diferentes fragmentos del gen de la AAO (banda recuadrada) amplificados por RT-PCR (A y D) y por PCR (B-C). Los gels se prepararon al 0,8% y tienen el *DNA molecular weight marker* VI (pocillo 1). **A)** Se amplificaron las últimas 883 pb del extremo 3' utilizando ADN_c, *Anchor* y SP4. **B)** Productos inespecíficos de una PCR realizada con una T_h de 50 °C, ADN genómico, SP5 y SP6. Sirvieron de molde para amplificar el fragmento de la imagen **C** con una T_h de 52 °C y los mismos cebadores. **D)** Se amplificaron 2423 pb con ADN_c, SP7 y SP8.

3.4.3.1. Región codificante

La región codificante consta de 1740 pb (incluyendo el codón de terminación TGA) y está interrumpida por 9 intrones. Su contenido en G+C (58,7%) es superior al de los intrones (46,2%) y al de la 3'-UTR (41,4%). Esto concuerda con la elevada frecuencia de los codones terminados en C, en comparación con los terminados en G, T y A (43, 28, 20 y 8%, respectivamente). Varios aminoácidos son codificados preferentemente por determinados codones. Por ejemplo, las 11 Tyr están codificadas por el codón TAC, las 2 Cys por el TGC y 22 de las 24 Phe por el TTC (**Tabla 3.8**).

3.4.3.2. Intrones

Los intrones de los hongos filamentosos son cortos en comparación con los de los eucariotas superiores. Esta característica se observa en los 9 intrones de la secuencia obtenida, cuya longitud varía entre 47 y 60 nt. Presentan secuencias consenso similares a las descritas en otras especies fúngicas, que participan en el proceso de corte y ajuste del ARN inmaduro (**Tabla 3.9**) (Ballance, 1986). Los extremos 5' y 3' contienen los motivos GTRMGY y YAG, respectivamente. Entre ambos se encuentra la secuencia RCTRAY (a 6-31 nt del motivo 3'), que se denomina centro de ramificación y está implicado en la formación de intermediarios con forma de lazo (*lariat*).

Los intrones de mamíferos presentan secuencias polipirimidínicas en las proximidades del extremo 3’ que son requeridas para su procesamiento. Sin embargo, en varias especies fúngicas se han descrito en la región anterior al centro de ramificación (Kupfer *et al.*, 2004). Para ello, se han localizado secuencias de 6 nucleótidos consecutivos que presenten al menos 3 T y ninguna A. La **Fig. 3.31** muestra el análisis realizado en los intrones de la AAO utilizando el mismo criterio. De los 9 intrones, 5 presentan al menos una región polipirimidínica anterior al centro de ramificación hipotético, 2 la presentan en la región posterior y en los 2 restantes no se ha localizado esta secuencia.

Otra característica de los intrones de hongos filamentosos, es que la región del exón adyacente al intrón no presenta ningún motivo conservado pero es frecuente que el último nucleótido sea una G (Ballance, 1986). En el caso de la AAO, este residuo se encuentra adyacente a 5 de los 9 intrones (**Fig. 3.31**).

Tabla 3.8. Uso de códones en la región codificante de la AAO.

Aa	Codón	Nº	%	Aa	Codón	Nº	%	Aa	Codón	Nº	%
Ala	GCC	19	33	His	CAC	11	79	Ser	TCC	11	28
	GCG	16	28		CAT	3	21		TCG	8	21
	GCT	16	28	Ile	ATC	26	84		TCT	8	21
	GCA	6	11		ATT	3	10		AGC	6	15
Arg	CGC	17	65		ATA	2	6		TCA	4	10
	CGG	4	15	Leu	CTC	15	32		AGT	2	5
	CGT	3	12		TTG	12	26	Thr	ACG	17	37
	AGG	2	8		CTG	10	21		ACT	15	33
	AGA	0	0		CTT	9	19		ACC	9	20
	CGA	0	0		CTA	1	2		ACA	5	11
Asn	AAC	22	76		TTA	0	0	Trp	TGG	9	100
	AAT	7	24	Lys	AAG	14	88	Tyr	TAC	11	100
Asp	GAC	27	73		AAA	2	13		TAT	0	0
	GAT	10	27	Met	ATG	15	100	Val	GTT	18	40
Cys	TGC	2	100	Phe	TTC	22	92		GTC	17	38
	TGT	0	0		TTT	2	8		GTG	8	18
Gln	CAG	13	72	Pro	CCC	18	44		GTA	2	4
	CAA	5	28		CCG	13	32	Stop	TGA	1	100
Glu	GAG	18	69		CCT	6	15		TAG	0	0
	GAA	8	31		CCA	4	10		TAA	0	0
Gly	GGT	16	35								
	GGC	15	33								
	GGA	10	22								
	GGG	5	11								

Tabla 3.9. Secuencias de procesamiento de intrones en el gen de la AAO.

Intrón	Longitud (pb)	Posición (nt)	Secuencia 5'→3'
I	54	65	<i>gtacgc...28...gctgac...11...cag</i>
II	55	201	<i>gtacgt...26...actgaa...14...cag</i>
III	52	417	<i>gtacgt...18...cctgat...19...cag</i>
IV	56	576	<i>gtgagt...10...tctgac...31...cag</i>
V	47	834	<i>gtgagt...26...actcac...6...tag</i>
VI	56	1067	<i>gtgagt...32...gctaaa...9...tag</i>
VII	60	1498	<i>gtaagc...30...actgat...15...tag</i>
VIII	52	1593	<i>gtgagt...30...actaac...7...cag</i>
IX	55	2083	<i>gtaagc...29...gctgac...11...cag</i>
Consenso	54		GTRMGY 25 RCTRAY 14 YAG

N = A, C, G o T; **D** = A, G o T; **M** = A o C; **R** = A o G; e **Y** = C o T. Los nucleótidos conservados en todos los intrones se destacan en negrita.

I GAG*gtacgccacaccgtcgcat*tgtatctctggtcgt*gctgac*atccccccaccag
 II CTC*gtacgtgctaaccgcgcgttacttccctgta***actgaa**tcttgtatcattgcag
 III TCAG*gtacgtctagagcatgaaacgggtcctgatacacccctcacc*cggtccatcag
 IV AAG*gtgagtccttgaaatc***cttgac**gaaacatgtcctttggtgtcaatcactatccacag
 V TCG*gtgagta*tttgcgcctttgaatattatgttttactcacaaatactag
 VI ATT*gtgagtac*ctatcaatttcgatttacgcgatgatgttag**actaa**cagcgggtgtag
 VII CCG*gtaagcaggg*gttgttcgacattctcaaaggcgaagactgatcttattcatcactatag
 VIII AGC*gtgagtg*cadctttttaactttgtcctttgctttttc**actaac**gattacacag
 IX TTG*gtaagc*tgatctgttcgtatcgttgtcgaacgtgctgaccttcgccttcag

Fig. 3.31. Secuencia (5'→3') de los intrones del gen de la AAO (minúscula y cursiva). Se numeran en números romanos según su posición. Se subrayan las secuencias consenso hipotéticas de ambos extremos y la del centro de ramificación. Las regiones polipirimidínicas (6 nt consecutivos con al menos 3 T y ninguna A) se indican recuadradas. Se muestran en mayúscula los 3 últimos nt de los exones (adyacentes al extremo 5' de cada intrón) y se destaca en negrita el último si es una G.

3.4.3.3. 3'-UTR

El ARN_m maduro de la AAO presenta una 3'-UTR de 203 nt, adyacentes al codón de terminación TGA. La señal de poliadenilación conservada en eucariotas superiores (AATAAA) no es frecuente en los genes fúngicos aunque en éstos han sido identificados diferentes motivos con una secuencia similar (Ballance, 1986). La 3'-UTR de la AAO contiene 3 posibles señales de poliadenilación con la secuencia AATA, situadas a 114, 81 y 21 nt del sitio de poliadenilación. También se han identificado dos motivos relacionados con la terminación de la transcripción en levaduras, con la secuencia TAGT y TTT (Zaret y Sherman, 1982), situados a 59 y 5 nt del sitio de poliadenilación, respectivamente (**Fig. 3.28**). La **Tabla 3.10** muestra la composición en nucleótidos de la 3'-UTR en comparación con las otras regiones secuenciadas del gen que codifica la AAO. La 3'-UTR presenta el contenido en T más elevado.

Tabla 3.10. Composición en nucleótidos de diferentes regiones del gen de la AAO.

Nt	ORF		Intrones		3'-UTR		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
A	348	20,0	112	23,0	46	22,7	506	20,8
T	370	21,3	150	30,8	73	36,0	593	24,4
G	467	26,8	101	20,7	37	18,2	605	24,9
C	555	31,9	124	25,5	47	23,2	726	29,9
Total	1740	100,0	487	100,0	203	100,0	2430	100,0

3.4.4. Análisis de la secuencia aminoacídica

3.4.4.1. Estructura primaria

3.4.4.1.1. Composición y sitios de glicosilación

El ORF del gen de la AAO del anamorfo de *B. adusta* codifica para 579 aminoácidos que presentan una masa molecular teórica de 62,450 kDa (proteína madura sin el péptido señal) (**Fig. 3.32**). Este valor se aproxima al estimado mediante SDS-PAGE para la enzima desglicosilada (70,314 kDa). El pI teórico es de 5,06, que es ligeramente superior al valor obtenido experimentalmente (4,45). Utilizando el servidor *EnsembleGly* (Caragea *et al.*, 2007), se identificaron en la secuencia aminoacídica 8 sitios potenciales de glicosilación mediante enlaces *N*-glicosídicos y ninguno mediante *O*-glicosídicos (**Fig. 3.32**). Las Asn implicadas en estos enlaces se encuentran en las posiciones 74, 120, 150, 309, 334, 359, 380 y 439, formando parte del motivo conservado NXT/S (dónde X es cualquier residuo excepto Pro) (Bause, 1983). La **Tabla 3.11** incluye la composición en aminoácidos de la AAO. Esta enzima presenta un 25% de residuos hidrófilos, un 54,4% de hidrófobos, un 10,9% de ácidos y un 9,7% de básicos. Entre los primeros se incluyen dos Cys en las posiciones 37 y 516, cuyos átomos de S están demasiado distantes para la formación de un puente disulfuro (37,71 Å) (**Fig. 3.32**).

Tabla 3.11. Composición en aminoácidos de la AAO.

Tipo	Aa	Nº	%	Aa	Nº	%	Tipo	Aa	Nº	%
Hidrófilos	Asn	29,0	5,0	Gly	46,0	7,9	Ácidos	Val	45,0	7,8
	Cys	2,0	0,3	Ile	31,0	5,4		Asp	37,0	6,4
	Gln	18,0	3,1	Leu	47,0	8,1		Glu	26,0	4,5
	Ser	39,0	6,7	Met	15,0	2,6	Básicos	Arg	26,0	4,5
	Thr	46,0	7,9	Phe	24,0	4,1		His	14,0	2,4
	Tyr	11,0	1,9	Pro	41,0	7,1		Lys	16,0	2,8
Hidrófobos	Ala	57,0	9,8	Trp	9,0	1,6				

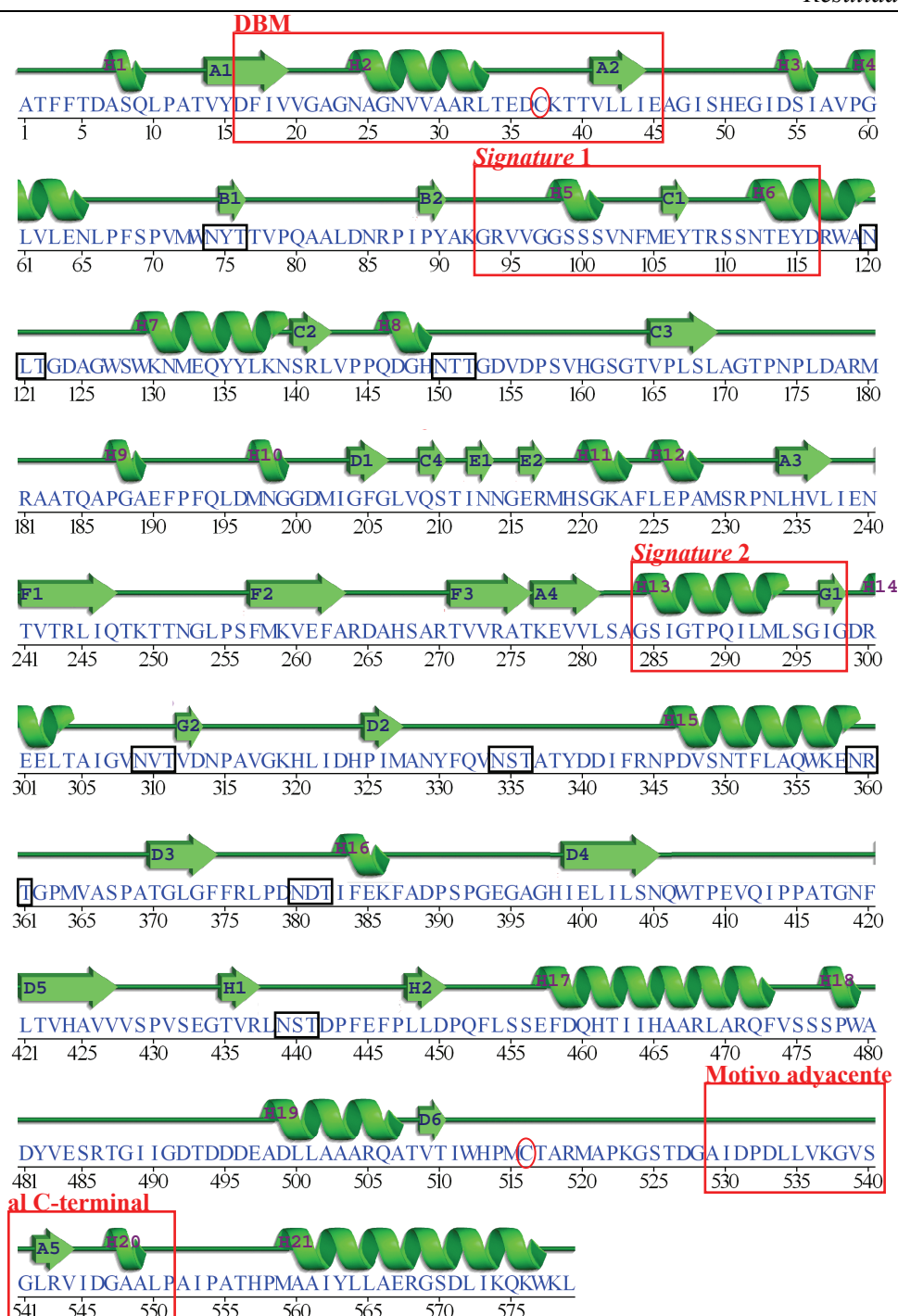


Fig. 3.32. Estructura primaria y secundaria de la AAO. Sitios potenciales de glicosilación (cuadros negros), Cys (elipses rojas) y motivos conservados en la familia GMC de oxidoreductasas (cuadros rojos). Obtenido con el servidor *PDBsum* (Laskowski, 2009).

3.4.4.1.2. Homología con las enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas

La AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta un 45% de identidad de secuencia con la AAO de *P. eryngii* (GenBank: AAC72747.1) y de *P. pulmonarius* (GenBank: AAF31169.1) y su identidad de secuencia con las AAO hipotéticas de otros basidiomicetos es de: 53% con la de *P. chrysosporium* (JGI: 135972), 46% con la de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (JGI: 52214), 44% con la de *P. placenta* (JGI: 55496) y 43% con la de *L. bicolor* (JGI: 252336). Además, presenta una homología significativa con otras enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas, como la piranosa deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa y colina deshidrogenasa (20-40% de identidad de secuencia). Los 4 motivos, conservados en esta familia, también se observan en la secuencia de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (Fig. 3.32 y 3.34):

- *Motivo de unión al ADP $\beta\alpha\beta$ (dinucleotide-binding motif, DBM)*: se sitúa en el extremo N-terminal (residuos 16-45). Este motivo está conservado en la mayoría de las proteínas dependientes de FAD y NAD (Wierenga *et al.*, 1986; Dym y Eisenberg, 2001). Su secuencia consenso es **o-h-x-h-x-G-x-G-x(2)-G-x(3)-h-x(2)-h-x(4)....h-x-h-x-[DE]**, donde **o** es un aminoácido polar o uno con carga, **h** es uno hidrofóbico y **x** es cualquiera.
- *Signature 1*: es una de las dos marcas de identidad de esta familia incluida en la base de datos *Prosites* (PS00623, residuos 93-116) (Hulo *et al.*, 2008). Su secuencia consenso se representa en la Fig. 3.33A mediante un logotipo.
- *Signature 2*: es la segunda región característica de esta familia que se incluye en la base de datos *Prosites* (PS00624, residuos 284-298). Su logotipo se muestra en la Fig. 3.33B.
- *Motivo adyacente al extremo C-terminal*: su secuencia consenso es **[VA]-x-D-x(4)-V-x-G-x(2)-[GN]-L-[RKY]-V-x-D-x-S-x(2)-P** (residuos 529-551).

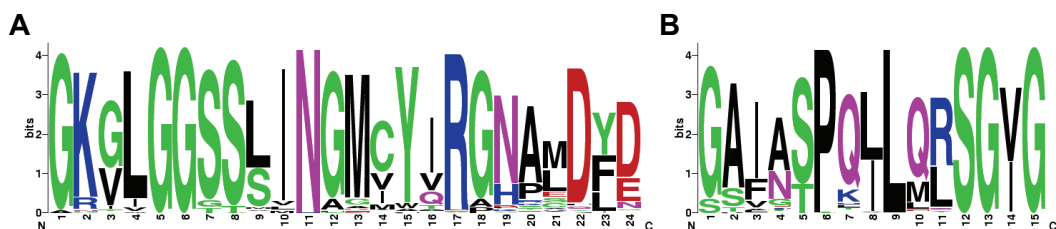


Fig. 3.33. Signature 1 (A) y Signature 2 (B). Basado en un alineamiento de 137 (A) y 138 (B) proteínas de UniProtKB/Swiss-Prot. El eje de abscisas indica el orden en la secuencia aminoacídica y el de ordenadas es proporcional al grado de conservación. Los residuos más frecuentes de cada posición se sitúan en la parte superior del eje de ordenadas y su longitud es mayor. Realizados con el servidor *WebLogo* (Crooks *et al.*, 2004).

		DBM		
AAO aBJAD	...ATFFTDAS.QLP...A..T.VYDFIVVGAGNAGNVVAARLTEDCKT.			39
AAO PLEERDFDYVVVGAGNAGNVVAARLTEDPDV.			27
CDHf PHACHPTVS..ATPYDYIIVGAGPGGIIAADRLSEAG.K.			31
CHOX ARTGOMHIDNIENL.....SDR.EFDYIVVGGSAGAAVAARLSEDP.A.V			38
GOX ASPNG	GIEASLLTDPK.DVS...G..R.TV	DYIIAGGGTLGLTTAARLTENPNI.		42
		:::..* * . * *::*		
AAO aBJAD	TVLLIEAGISHEG...I.....D.SIAVPGLVLENLPF....S			69
AAO PLEER	SVLVLEAGVSDEN...V.....L.GAEAPLLAPGLVPN....S			57
CDHf PHACH	KVLLLERGGPSTKQTGGTYVAPWATSSGLT.KFDIPGLFESLF..TDSNP			78
CHOX ARTGO	SVALVEAGPDDRG...V.....P.EVLQLDRWMELL.E....S			67
GOX ASPNG	SVLVIESGSYESD...R.....GPIIEDLNAYGDIF.G....S			72
		.*:::* *		
		Signature 1		
AAO aBJAD	PVMWN.YTTVPQAALDNRPYPYAKGRVVGSSSVNFMEYTRSSNTEYDR.			117
AAO PLEER	IFDWN.YTTTAQAGYNGRSIAYPRGRMLGGSSSVHYVMVMRGSTEDFDR.			105
CDHf PHACH	FVWCKDIT.....VFAGCLVGGGTSVNGALYWYPNDGDFSS			115
CHOX ARTGO	GVDWD.YPIEPQENG.N.SFMRHARAKVMGGCSSHNSCIAFWAPREDLDE.			114
GOX ASPNG	SVDAH.YETVELAT.NNQTALIRSENGLGGSTLVNGGTWTWRPHKAQVDS.			119
		. : ** : : : .		
AAO aBJAD	..WAN.LTG.DAGWSWKN.MEQYYLKN SRLVPP.....QD..GHNTTGD			154
AAO PLEER	..YAA.V.TGDEGWNWDN.IQQFVRKNEMVV..PPADNHN..TS....GE			142
CDHf PHACH	VGW.....P.SS.WT..N.HAPYTSKLS.....			133
CHOX ARTGO	..WEAKYGA.TG.WNA.EAAWPLYKRLETNE.....			140
GOX ASPNG	..WETVFGN.EG.WNWDN.VAAYSLQAERARAP.....NAKQ.IAAGHY			157
		: * . : : .		
AAO aBJAD	VDP....SV..HSGTVPLSLA.G....TP...N.PL.D.A.RMRAA...			183
AAO PLEER	FIP....A.VHGTNGSVSISLP.G.....F..PT.PL.D.RVLAT..T			173
CDHf PHACHSRLPSTDHPS.TDGQRY..LE.QSFN..VVS.QLLK			162
CHOX ARTGO	..DAGPDAPHHGDSGPVHLMNV.....P..PKD.PTG.V.ALLDA.CE			175
GOX ASPNG	FNA....S.CHGVNGTVHAGPR.DT...G.DD.Y..S.PIVKALM.S...			189
		. : : .		
AAO aBJAD	TQAPGAE.FPFQLDMN..GGDMI.GFGLVQSTINN.GERMHSGKAFLEPA			228
AAO PLEER	QEQS..EEFFFNPDGMG..TGHPL.GISWSIASVGN.GQRSSSSTAYLRPA			217
CDHf PHACH	.GQG...YNQAT.INDNPNYKDHVFGYSAFDL.N.GKRAGPVATYLQTA			205
CHOX ARTGO	.QAG...IPRAK.FN.TGTTVVNGANFFQINRRADGTRSSSSSVSYIHPI			218
GOX ASPNG	.AVEDRG.VPTKKDFG..CGDPH.GVSMFPNTLHEDQVRSDAAREWLLPN			234
		: . . * . : : .		

Fig. 3.34. Alineamiento estructural y de secuencia de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (aBJAD) con otras proteínas de la familia GMC de oxidorreductasas. AAO PLEER, AAO de *P. eryngii* (PDB: 3FIM); CDHf PHACH, dominio flavo de celobiosa deshidrogenasa de *P. chrysosporium* (PDB: 1KDG); CHOX ARTGO, colina oxidasa de *A. globiformis* (PDB: 2JBV); y GOX ASPNG, glucosa oxidasa de *A. niger* (PDB: 1CF3). Se recuadran 4 motivos conservados en la familia GMC de oxidorreductasas y dos residuos conservados próximos a la flavina (His e His/Asn) y se destacan con diferentes colores los principales elementos estructurales que no son iguales en todas las enzimas. Alineamiento *ClustalW* realizado con el programa *Chimera*.

AAO aBJAD	MSRPNLHVLIENTVTRLIQ.TKTTN..GLPSFMKVEFARDAHS.AR....	270
AAO PLEER	QSRPNLSVLINAQVTKLVNSG...TTNGLPAFRCVEYAEQE.GAPT....	259
CDHf PHACH	LARPNTFKTNMVMNSVVR.NG.....SQILGVQTN.....DPTL	239
CHOX ARTGO	VEQENFTLLTGLRARQLVF.DA..D....RRCRGVDIVDSA.FGHT....	256
GOX ASPNG	YQRPNLQVLTGQYVGKVL.L.SQ.NG..TTPRAVGVEFG.THKG.NT....	274
	: *: *:	
	Signature 2	
AAO aBJAD	...TVVRAT..KEVVLSSAGSIGTPQILMLSGIGDREE.LTAI.GV.....	308
AAO PLEER	...TTVCAK..KEVVLSSAGSVGTPILLQLSGIGDEND.LSSV.GI.....	297
CDHf PHACH	GPNGFIPVTPKGRVILSAGAFGTSRILFQSGIGPT.DMIQ.TVQ.SNPTA	286
CHOX ARTGO	...HRLTAR..NEVVLSTGAIDTPKLLMLSGIGPAAH.LAEH.GI.....	294
GOX ASPNG	...HNVYAK..HEVLLAAGSAVSPTILEYSGIGMKSI.LEPL.GI.....	312
	: . . *: *: *: . . : *	
AAO aBJADN..VTVDNPAVGKHLIDHPIMANYFQVNS..TA..TY.D.DI..	342
AAO PLEERD..TIVNNPVSGRNLSDHLLLPAAFFVNS..NQT....FDNI..	331
CDHf PHACH	AAALPPQNQW.INL.PVGMNAQDNPSINLVFTHP..SI.D...AY.E.NW	326
CHOX ARTGOE..VLVDSPGVGHEHLQDHPEGVVQFEAKQ..P.MV.A.....	325
GOX ASPNGD..TVVDL.PVGLNLQDQTATVRSRITSAG.A.G.....	342
	: : : ** : *	
AAO aBJAD	FRN...PDVSNT.FLAQWKENRTGPMVASP...ATGLGFFRLPD.....	379
AAO PLEER	FRD...SSEFNV.DLDQWTNTRTGPLT.A..LIANHLLAWLRLP.....	368
CDHf PHACH	AD.VWSN..PRPADAAQYLANQSGVFA...GASPKLNFWRAYS.....	363
CHOX ARTGOE...S.TQWWEIGIFTPTED.....	341
GOX ASPNGQ...GQAWFATFN.ETFGDY.....	359
	:	
AAO aBJAD	NDTI.FEKFADPSP.....G.	393
AAO PLEER	NSSI.FQTFP.....DPAA.G.	382
CDHf PHACH	...GS...DG.....F...T	369
CHOX ARTGOG.....	342
GOX ASPNG	SEKA.HELLN....TKLEQWAEAEAVARGGFHNTTALLIQYENYR...DWI	401
AAO aBJAD	..EGAGHIELILSNOWTPEV..Q.I.P.....PA.....T.GNFLT	423
AAO PLEER	..PNSAHWETIFSNQ.WFHPAIP..RP.....DT.....G.S.FMSV	412
CDHf PHACH	...RYAQGTVRPG.A.AS.....V...NS...SLPYNA.SQIFTI	397
CHOX ARTGO	..LDRPDLMMHYGSV.PF.DMN.TL...RHGYPT.....TEN.GFSL	375
GOX ASPNG	VNHNVAYSELFDTA.....GVASF	421
	:.	
AAO aBJAD	HAVVV.SPVSEGTVRLNSTDPF.E.FPLLD.PQFLSS..EFDQHTIIH.A	466
AAO PLEER	TNALI.SPVARGDIKLATSNPF.D.KPLIN.PQYLST..EFDIFTMIQ.A	455
CDHf PHACH	TVYLSTGIQSRGRIGIDA....ALRGTVLTPPWLVN..PVDKTVLLQAL	440
CHOX ARTGO	TPNVT.HARSRGTVRLRSRDFR.D.KPMVD.PRYFTDPGHDMRVMVA.G	420
GOX ASPNG	DVWDL.LPFTRGYVHILDKDPYLHH.FAYD.PQYFLN..ELDLLGQAA.A	465
	:.* : : * : :	

Fig. 3.34. (Continuación).

AAO aBJAD	ARLARQFV.S.SSPWADYV.ESRT.G.II.GDT...DDD.E.ADLLAAA	504
AAO PLEER	VKSNLRFL.S.GQAWADFV.IRPF.D..PRLRD..PTDD...AAIESYI	493
CDHf PHACH	.HDVVS..NIGS..IPG.L.TMI.TP..D..V.TQ..T..LE.E...YV	468
CHOX ARTGO	IRKAREIA.A.QPAMAEWT.GRELSP..G..V.EA..QT..DEE.LQDYI	457
GOX ASPNG	TQLARNIS.N.SGAMQTYFAGETIPGDN.LAYD...ADL.S.A.WTEYI	505
:		
AAO aBJAD	.RQA..TVTIW...PMCTARMAPKGS.T.DGAIDPDLVKGVSGLRVIDGAA	549
AAO PLEER	.RDN..ANTIF...PVG TASMSPRGA.S.WGVDPDLKVGVDGLRIVDGS	538
CDHf PHACH	DAYDPATMNSNHWVSSTTIGS..SPQ.SAVVDSNVKVFGTNNLFIVDAGI	515
CHOX ARTGO	.RKT..HNTVY...PVGTVRMGAVED.E.MSPLDPELRVKGV TGLRVADASV	502
GOX ASPNG	.PYH..FRPNY...GVGTCSMMP..K.EMGGVVDNAARVYGVQGLRVIDGSI	549
* : : : . . : * * * . * : * .		
AAO aBJAD	LPAIPATHIPMAAIYLLAERGSGLIKQK..WKL...	579
AAO PLEER	LPFAPNAHTQGPIYLVGKQGADLIKAD..Q....	566
CDHf PHACH	IPHLPTGNPQGTLM SAAEQAAAKILALAGG....P	546
CHOX ARTGO	MPEHVTVPNITVMMIGERCADLIRSA..R....	530
GOX ASPNG	PPTQMSSEHMTVFYAMALKISDAILED..YASMQ.	581
* : . . : : *		

Fig. 3.34. (Continuación).

3.4.4.2. Estructura secundaria

La secuencia aminoacídica de la AAO del anamorfo de *B. adusta* se pliega formando 21 hélices α (H) y 8 láminas β (A-H) (Fig. 3.32). La Tabla 3.12 incluye el número de hebras β que constituyen cada lámina β y su disposición. Las hebras β y las hélices α se numeran en función de su posición en la secuencia aminoacídica y la letra de las hebras β indica la lámina β .

Tabla 3.12. Láminas β en la estructura secundaria de la AAO del anamorfo de *B. adusta*.

Lámina β	Nº de hebras β	Disposición de las hebras β
A	5	Paralela
B	2	Antiparalela
C	4	Mixta
D	6	Mixta
E	2	Antiparalela
F	3	Mixta
G	2	Paralela
H	2	Antiparalela

La estructura secundaria hipotética de la AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta una homología significativa con la estructura secundaria de la AAO de *P. eryngii* (Varela *et al.*, 1999), aunque se observan algunas diferencias entre ellas (Fig. 3.35). Por ejemplo, la longitud de la hélice α H9 de la AAO del anamorfo de *B. adusta* es considerablemente menor y esta AAO no incluye una lámina β entre las hebras β F1 y F2, a diferencia de la AAO de *P. eryngii*.

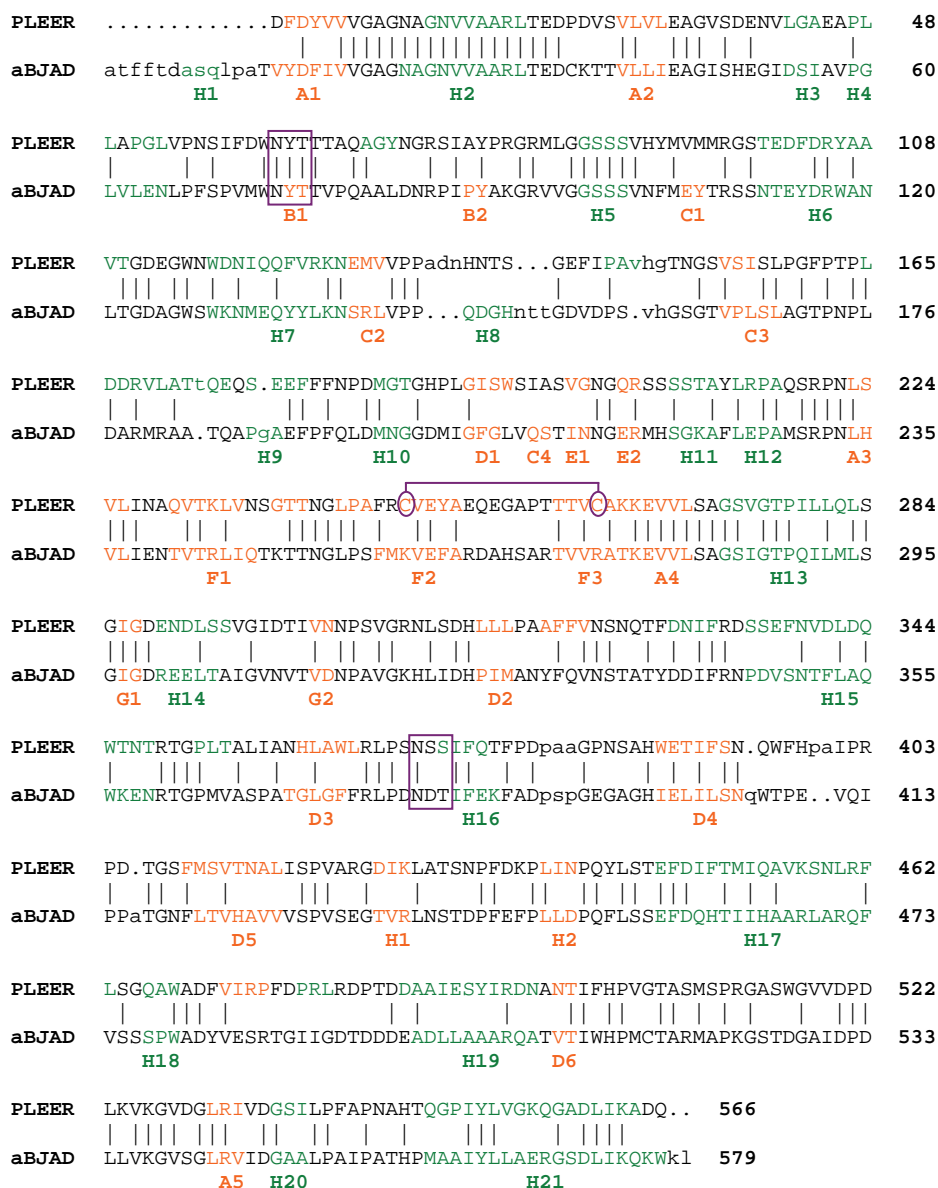


Fig. 3.35. Alineamiento estructural de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (aBJAD) y de *P. eryngii* (PLEER). Se destacan las hebras β (naranja) y las hélices α (verde). Los aminoácidos que coinciden en ambas secuencias se indican con barras verticales. Los sitios potenciales de glicosilación que coinciden en ambas AAO se muestran recuadrados (2). Se indica un puente disulfuro en la AAO de *P. eryngii*. Análisis realizado con el servidor *Dali* (*Z-score* = 52,3) (Holm y Park, 2000).

3.4.4.3. Estructura terciaria

Se generó un modelo molecular de la AAO del anamorfo de *B. adusta* basado en la estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii* (PDB: 3FIM) y de la glucosa oxidasa de *A. niger* (PDB: 1CF3), utilizando el servidor *SWISS-MODEL* (**Fig. 3.36**). Este modelo exhibe la topología típica de las proteínas incluidas en la familia GMC de oxidorreductasas. En términos generales, se distinguen en ellas dos dominios, un dominio muy conservado de unión al FAD y un dominio más variable, acorde a la diferente especificidad de sustrato de las enzimas de esta familia. El cofactor adopta conformación alargada, con la adenina orientada hacia el primer dominio mencionado y el anillo de isoaloxazina en el extremo opuesto. Mediante un análisis más exhaustivo, en las proteínas de la familia GMC de oxidorreductasas se distinguen 5 regiones que constituyen los dos dominios mencionados (Kiess *et al.*, 1998). A continuación, estas 5 regiones se describen en el modelo de la AAO generado y se indican varias interacciones potenciales en las que participan residuos conservados.

3.4.4.3.1. Región de unión al FAD

La región más próxima al FAD consta de las hélices α H2, H13, H20 y H21 y de las láminas β A y F (**Fig. 3.36**, azul). La lámina β A se sitúa entre la lámina β F y las hélices α H2 y H21, formando una variante del dominio Rossmann observada en otras proteínas dependientes de FAD (Dym y Eisenberg, 2001). Esta región contiene 3 de los 4 motivos característicos de la familia GMC de oxidorreductasas (**Apartado 3.4.4.1.2**). A continuación, se describen en el modelo generado:

- **Motivo DBM:** constituye las hebras β A1 y A2 y la hélice α H2 (**Fig. 3.32**). Los residuos hidrofóbicos F17, V19, A30, L33, V41 y L43 favorecen probablemente interacciones entre las hélices α y las hebras β . El residuo ácido E45 podría formar puentes de hidrógeno con la ribosa del FAD (**Fig. 3.40**). Las glicinas (G21, G23 y G26) facilitan un plegamiento adecuado para que el extremo N-terminal de la hélice α H2 se sitúe próximo al grupo pirofosfato del FAD compensando su carga (Wierenga *et al.*, 1985; Hecht *et al.*, 1993). El residuo R32 forma probablemente un puente salino con el E567, conectando las hélices α H2 y H21 (Kiess *et al.*, 1998).
- **Signature 2:** se encuentra en la hebra β G1 y en la hélice α H13 (**Fig. 3.32**). Ésta última está próxima a la adenina del FAD. Entre los numerosos residuos conservados en este motivo se incluyen la G284, T288, P289, L292, S295, G296, I297 y G298. Esta región podría participar en varias interacciones para estabilizar la estructura. Por ejemplo, la G284 y la T288 interaccionan

probablemente con el residuo absolutamente conservado D546 (Kiess *et al.*, 1998).

▪ *Motivo adyacente al extremo C-terminal*: incluye la hebra β A5 y la hélice α H20 (**Fig. 3.32**). Como se observa en la **Fig. 3.34**, en la posición del residuo neutro L535 de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, generalmente hay residuos cargados. Además del residuo ácido D546, la P551 está también absolutamente conservada (Kiess *et al.*, 1998). A continuación de este motivo, la hélice α H21 constituye el extremo C-terminal de la secuencia aminoacídica (**Fig. 3.32**). El extremo N-terminal de esta hélice α se encuentra muy próximo al anillo de isoaloxazina del FAD, e incluye la M559 que forma probablemente un puente de hidrógeno con el grupo O^2 de la flavina (**Fig. 3.40**). Además, en la hélice α H21 se sitúan varios residuos conservados, como E567, R568 e I573.

3.4.4.3.2. Extensión de la región de unión al FAD

Se trata de varias regiones separadas, de longitud reducida, que son adyacentes a la región descrita en el apartado anterior. Incluye las hélices α H1, H3, H4, H11, H12 y H14 (**Fig. 3.36**, rojo).

El extremo N-terminal de la secuencia aminoacídica se considera parte de esta región. Las hélices α H3 y H4 cubren el centro activo, su longitud difiere entre los diferentes tipos de enzimas de esta familia (**Fig. 3.34**, amarillo) (Hallberg *et al.*, 2002). El residuo F224 conecta probablemente las hélices α H11 y H12 y en su posición es frecuente la presencia de un residuo aromático (**Fig. 3.34**). La hélice α H14 está presente en todas las enzimas de esta familia, a excepción de la colesterol oxidasa. Esta hélice establece contactos con la lámina β H y podría influir en la posición que ocupa (Kiess *et al.*, 1998).

3.4.4.3.3. Tapa del FAD

La tapa del FAD comprende la región contigua a las hélices α H3 y H4. Concretamente, está delimitada por los residuos 71 y 93, e incluye la lámina β B (**Fig. 3.34**, morado; y **Fig. 3.36**, marrón). La extensión de estas regiones varía entre las diferentes proteínas de la familia GMC de oxidorreductasas (Hallberg *et al.*, 2002).

3.4.4.3.4. Región intermedia y hélice α H5

La tapa del FAD está conectada con la región intermedia mediante la hélice α H5. La región intermedia consta de las hélices α H6, H7, H8, H9 y H10, la lámina β C y la hebra β D1 (**Fig. 3.36**, verde).

El motivo denominado *Signature 1*, conservado en las proteínas de la familia GMC de oxidorreductasas, incluye la hélice α H5 completa y una parte de la H6

y también la hebra β C1 situada entre ambas (**Fig. 3.32**). Presenta los residuos S99, F104 y E106, que forman probablemente puentes de hidrógeno con el FAD (**Fig. 3.40**). La N103, probablemente participe en interacciones hidrofóbicas con el anillo de isoaloxazina (Kiess *et al.*, 1998). Otros residuos conservados en este motivo son la V93, G97, G98, S100, R109 y E114.

3.4.4.3.5. Región de unión al sustrato

La secuencia de la región de unión al sustrato es continua y está compuesta por las láminas β D y H y las hélices α H15, H16, H17, H18 y H19 (**Fig. 3. 36**, naranja). Esta región varía entre las diferentes enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas, pero en todas incluye una larga lámina β antiparalela y una hélice α en la posiciones ocupadas por la lámina β D y la hélice α H17 de la AAO del anamorfo de *B. adusta*.

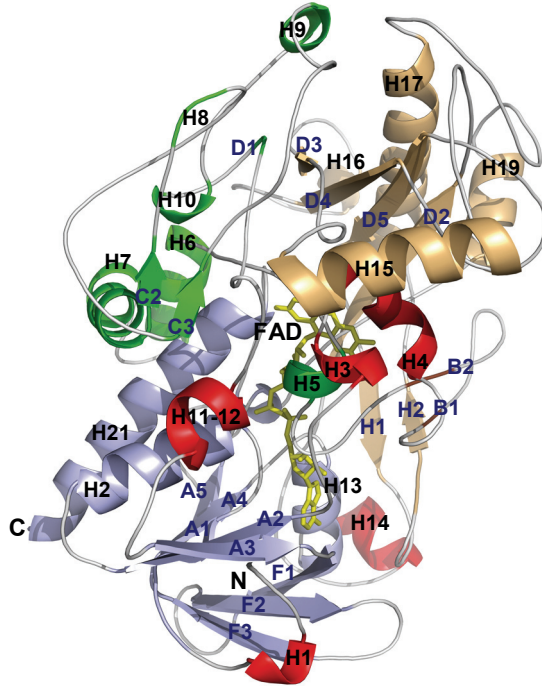
La AAO de *P. eryngii* y las celobiosa deshidrogenasas, presentan una hélice que corresponde a la hélice α H15 de la AAO del anamorfo de *B. adusta* y probablemente las otras AAO y las metanol oxidasas también (**Fig. 3.37**). Sin embargo, esta hélice está ausente en la glucosa oxidasa, hidroxinitrilo liasa, colina oxidasa y colesterol oxidasa (**Fig. 3.34**, verde).

La glucosa oxidasa incluye 3 hélices en este dominio (H8, H9 y H10) (Kiess *et al.*, 1998) que no están presentes en las AAO, aunque la hélice α H16 de la AAO del anamorfo de *B. adusta* ocupa la misma posición que un fragmento de la H8 de la glucosa oxidasa (**Fig. 3.34**, azul).

AAO POSPL	338	N	T	N	D	E	Y	A	R	-	N	A	T	L	A	A	E	A	L	V	Q	W	N	A	T	G	T	G	F	V	D	N	G	V	-	370		
AAO LACBI	337	A	S	L	D	G	L	M	R	-	D	T	T	L	F	S	V	A	L	N	L	W	N	T	T	K	T	G	T	L	A	N	-	G	I	V	-	369
AOX CANBO	322	E	S	F	D	A	F	V	S	G	D	K	E	A	Q	K	S	A	F	D	Q	W	Y	A	T	G	A	G	P	L	A	T	N	G	I	-	355	
AOX PICAN	324	P	T	F	D	D	F	V	R	G	D	P	V	A	Q	K	A	A	F	D	Q	W	Y	S	N	K	D	G	P	L	T	T	N	G	I	-	357	
AAO PHACH	336	D	T	F	D	D	V	Y	R	-	D	T	S	V	F	N	A	K	L	A	Q	W	Q	S	S	R	T	G	L	F	A	D	S	P	T	-	368	
AAO aBJAD	337	A	T	Y	D	D	I	F	R	-	N	P	D	V	S	N	T	F	L	A	Q	W	K	E	N	R	T	G	P	M	V	A	S	P	A	-	369	
AAO PLEOS	330	Q	T	F	D	N	I	F	R	-	D	S	S	E	F	N	A	D	L	D	Q	W	T	N	S	R	T	G	P	L	T	A	L	I	A	-	362	
AAO PLEER	326	Q	T	F	D	N	I	F	R	-	D	S	S	E	F	N	V	D	L	D	Q	W	T	N	T	R	T	G	P	L	T	A	L	I	A	-	358	
AAO PLEPU	326	Q	S	F	D	N	L	F	R	-	D	S	S	E	F	N	A	D	L	D	Q	W	T	N	T	R	T	G	P	L	T	A	L	I	A	-	358	
CDHf PHACH	321	D	A	Y	E	N	W	A	D	V	W	S	N	P	R	P	A	D	A	A	Q	Y	L	A	N	Q	S	G	V	F	A	G	A	S	P	-	354	

Fig. 3.37. Alineamiento de la hélice α H15 de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (aBJAD), con las regiones correspondientes de otras proteínas de la misma familia. AAO POSPL, AAO de *P. placenta* (JGI: 55496); AAO LACBI, AAO de *L. bicolor* (JGI : 252336); AOX CANBO, alcohol oxidasa de *Candida boidinii* (GenBank: AAV66467.2); AOX PICAN, alcohol oxidasa de *Pichia angusta* (GenBank: CAM84032.1); AAO PHACH, AAO de *P. chrysosporium* (JGI: 135972); AAO PLEOS, AAO de *P. ostreatus* (JGI: 52214); AAO PLEER, AAO de *P. eryngii* (GenBank: AAC72747.1); AAO PLEPU, AAO de *P. pulmonarius* (GenBank: AAF31169.1); y CDHf PHACH, dominio flavo de celobiosa deshidrogenasa de *P. chrysosporium* (GenBank: CAA61359.1). Alineamiento ClustalW obtenido con *The Biology WorkBench*. Se indican los residuos completamente conservados (fondo negro), los idénticos (fondo gris oscuro) y los similares (fondo gris claro).

A



B

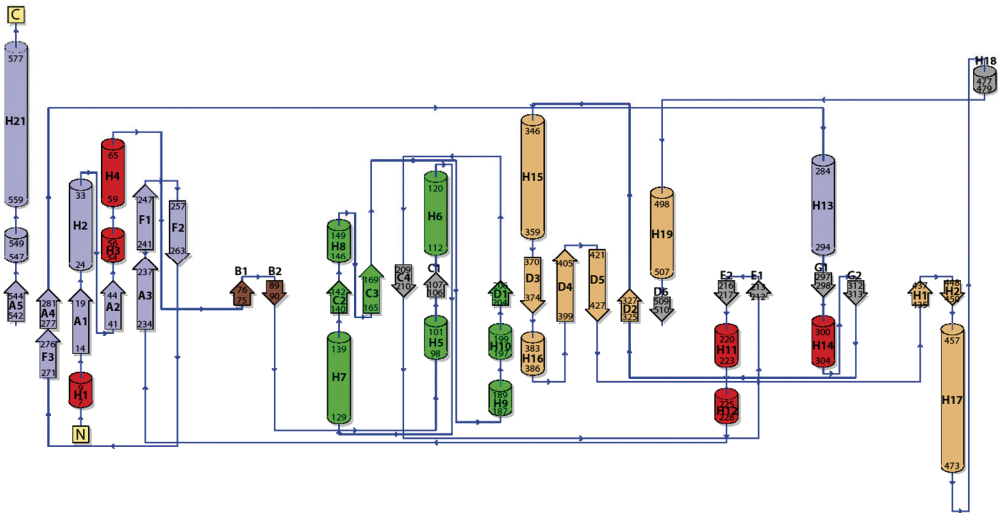


Fig. 3.36. Modelo molecular de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (A) y su diagrama topológico (B). Azul, región de unión al FAD; rojo, extensión de la región de unión al FAD; marrón, tapa del FAD; naranja, región de unión al sustrato; y verde, región intermedia. Las láminas β se representan con flechas y las hélices α como espirales (A) o cilindros (B). Se indica la posición de los residuos que las delimitan (B) y el extremo N- y C-terminal de la secuencia.

3.4.4.3.6. Entorno del FAD

En la AAO del anamorfo de *B. adusta*, el anillo de isoaloxazina del FAD se sitúa próximo a los residuos V102, N103, F104, E106, E400, W512, H513, H557 y M559 (**Fig. 3.38**). La H513 está conservada en todos los miembros de la familia GMC de oxidorreductasas, mientras que la H557 está reemplazada por una Asn en algunos (Kiess *et al.*, 1998; Dreveny *et al.*, 2001). Las posiciones de los residuos W512 y V102 están ocupadas frecuentemente por aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, respectivamente (**Fig. 3.34**). En cuanto a la F104, la AAO de *P. eryngii* presenta otro residuo aromático en la misma posición (Y92). Generalmente, la N103 está conservada pero en la AAO de *P. eryngii* y de *P. pulmonarius* está reemplazada por la H91. Varias proteínas de la familia GMC de oxidorreductasas incluyen un residuo ácido en la posición del E400, mientras que ninguna de estas proteínas presenta otro residuo ácido en la posición del E106 de la AAO del anamorfo de *B. adusta*. El grupo E106-O^{e1} está situado a tan sólo 2,61 Å del grupo H557-N^{e2} y el E106-N se encuentra a 3,24 Å del FAD-O⁴. Este residuo está remplazado por una Val en las AAO del género *Pleurotus* y en las AAO hipotéticas de *L. bicolor* (JGI: 252336) y de *P. placenta* (JGI: 55496), mientras que la AAO hipotética de *P. chrysosporium* (JGI: 135972) presenta una Ala en la misma posición. La glucosa oxidasa incluye una Met en la posición de la M559 de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, mientras que las otras AAO mencionadas presentan el residuo hidrófilo Gln.

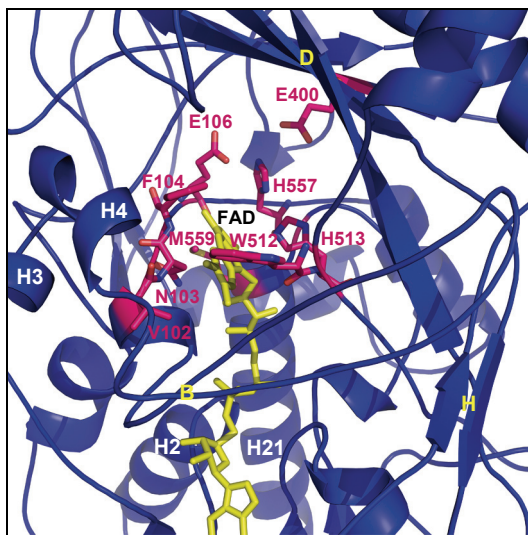


Fig. 3.38. Entorno del anillo de isoaloxazina del FAD en el modelo de la AAO del anamorfo de *B. adusta*. Se rotulan los residuos próximos a la flavina (rosa), varias hélices α (H2, H3, H4 y H21, blanco) y láminas β (B, D y H, amarillo).

Además de los residuos próximos al anillo de isoaloxazina, la **Fig. 3.39A** incluye los demás residuos situados en el entorno del FAD de la AAO del anamorfo de *B. adusta*. Todos ellos coinciden con los del entorno de la AAO de *P. eryngii*, a excepción de los 11 residuos de la **Fig. 3.39B**. Estos últimos se muestran superpuestos con los residuos de *P. eryngii* que ocupan la misma posición. Los que están próximos al anillo de isoaloxazina acaban de ser mencionados. En base a sus propiedades, los residuos I44, K92, V95 y T241, de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, son equivalentes a L32, R80, M83 y Q230 de la AAO de *P. eryngii*, respectivamente. La N65 de la AAO del anamorfo de *B. adusta* coincide con la N64 de la AAO de *P. chrysosporium* (JGI: 135972), pero las demás AAO presentan una Leu como *P. eryngii*. El residuo polar T547 de la AAO de *P. eryngii* ocupa la misma posición que los hidrofóbicos P558 y P554 de la AAO de *B. adusta* y de *P. chrysosporium* (JGI: 135972), respectivamente. En la misma posición, otras enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas también tienen un residuo hidrofóbico (**Fig. 3.34**).

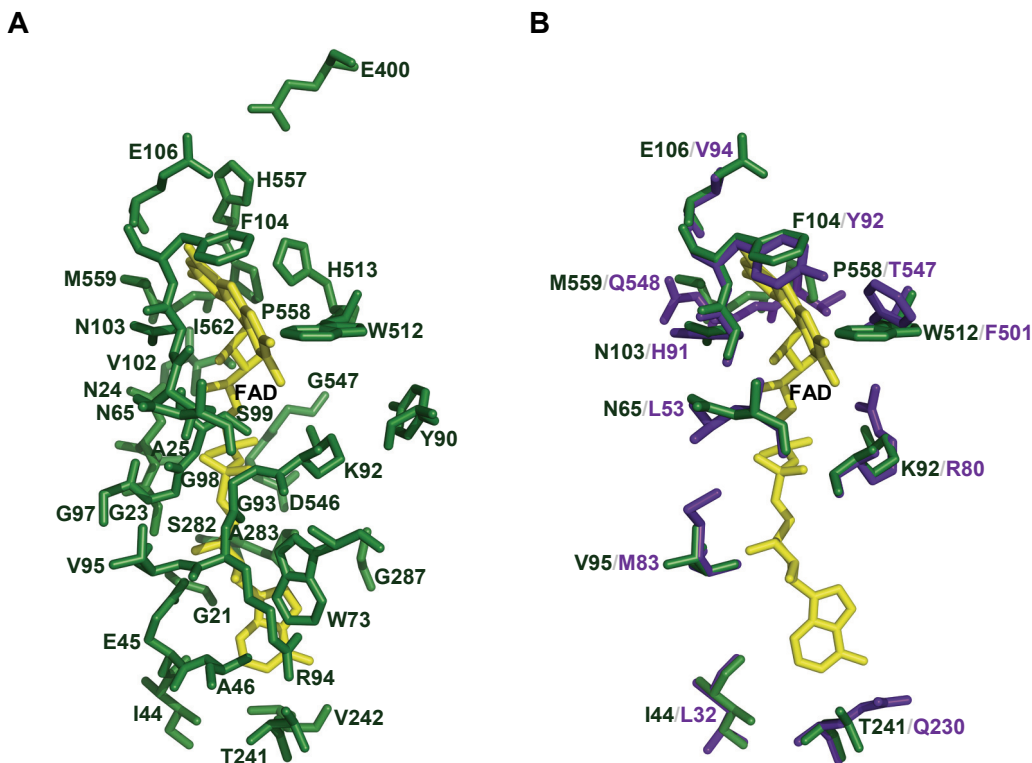


Fig. 3.39. Comparación del entorno del FAD de la AAO del anamorfo de *B. adusta* y de *P. eryngii*. A) Todos los residuos de la AAO del anamorfo (verde) próximos al FAD (amarillo). B) Únicamente los residuos de A que son diferentes a los de la AAO de *P. eryngii* (morado).

3.4.4.3.7. Interacciones polares entre el FAD y los residuos de su entorno

En la **Fig. 3.40** se muestran las interacciones polares hipotéticas entre el FAD de la AAO del anamorfo de *B. adusta* y los residuos adyacentes. La mayoría de las interacciones propuestas se han descrito en la estructura cristalográfica de la glucosa oxidasa de *A. niger* y de otras enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas (Hecht *et al.*, 1993; Dreveny *et al.*, 2001). Fernández *et al.* (2009) han descrito recientemente en la estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii* las interacciones entre el cofactor y los residuos de su entorno. En esta AAO, el FAD interacciona con la apoproteína mediante una red de puentes de hidrógeno, en los que participan predominantemente los residuos del N-terminal (los grupos CO y NH de sus cadenas principales) y además varias moléculas de H₂O. Los residuos de la AAO de *P. eryngii* que interaccionan con el cofactor están conservados en la AAO del anamorfo de *B. adusta*, a excepción de la Y92, V94, T547 y Q548. Como se ha mencionado anteriormente, la Y92 está reemplazada en la AAO del anamorfo por otro residuo aromático (F104). Sin embargo, los residuos polares, T547 y Q548, corresponden en la AAO del anamorfo de *B. adusta* a residuos hidrofóbicos (P558 y M559, respectivamente). Además, la V94 de la AAO de *P. eryngii*, está sustituida por un residuo ácido en la AAO del anamorfo de *B. adusta* (E106). En la estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii* se han descrito 18 puentes de hidrógeno con el FAD. En el modelo teórico de la AAO del anamorfo de *B. adusta* se observan las mismas interacciones, salvo algunas modificaciones. Así, el E106 y la P558, de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, interaccionan con el átomo O² del anillo de isoaloxazina, a diferencia de los correspondientes residuos de la AAO de *P. eryngii*. Además, esta última AAO presenta 4 puentes de hidrógeno, en los que participan los residuos N12, G81, y T547 (N24, G93, y P558 en el anamorfo, respectivamente), que no están presentes en el modelo propuesto de la AAO del anamorfo.

3.4.4.4. Análisis filogenético

El árbol filogenético de la **Fig. 3.41** representa las relaciones evolutivas entre la AAO del anamorfo de *B. adusta*, varias enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas y tres proteínas representativas de la familia vainillil-alcohol oxidasa. Este análisis confirma inequívocamente que la AAO del anamorfo de *B. adusta* corresponde a la primera familia mencionada y que las proteínas de la familia vainillil-alcohol oxidasa constituyen un grupo independiente (**Fig. 3.41**, naranja).

En la familia GMC de oxidorreductasas se distinguen 5 grupos principales, con valores de *bootstrap* elevados. El grupo más numeroso está compuesto por 3

secciones (**Fig. 3.41**, azul). Una de ellas agrupa a las colina oxidasas con diversas deshidrogenasas, otra sección incluye a las glucosa oxidasas y a las alcohol oxidasas y la última sección está constituida por las AAO y las piranosa deshidrogenasas. La AAO del anamorfo de *B. adusta* se asocia más estrechamente con las AAO hipotéticas de *P. chrysosporium* y de *P. placenta*, pero los valores de *bootstrap* son bajos (48 y 47%, respectivamente). El segundo grupo de la familia GMC de oxidorreductasas, próximo al anterior, está constituido exclusivamente por las hidroxinitrilo liasas que contienen FAD (**Fig. 3.41**, verde). En estas enzimas, sintetizadas por plantas, el cofactor no está implicado directamente en la catálisis y se ha contemplado la posibilidad de que sea un vestigio de un antecesor (Dreveny *et al.*, 2001). Los dominios flavo de las celobiosa deshidrogenasas constituyen otro grupo (**Fig. 3.41**, morado). En éste se diferencian 2 subgrupos, uno de ascomicetos y otro de basidiomicetos. Estas flavoenzimas adquirieron posteriormente dominios citocromos para incrementar su eficacia catalítica (Zámocký *et al.*, 2004). Otro grupo de esta familia está constituido por las colesterol oxidasas bacterianas (**Fig. 3.41**, marrón). Éste se relaciona estrechamente con el que incluye a las piranosa 2-oxidasas (**Fig. 3.41**, rojo).

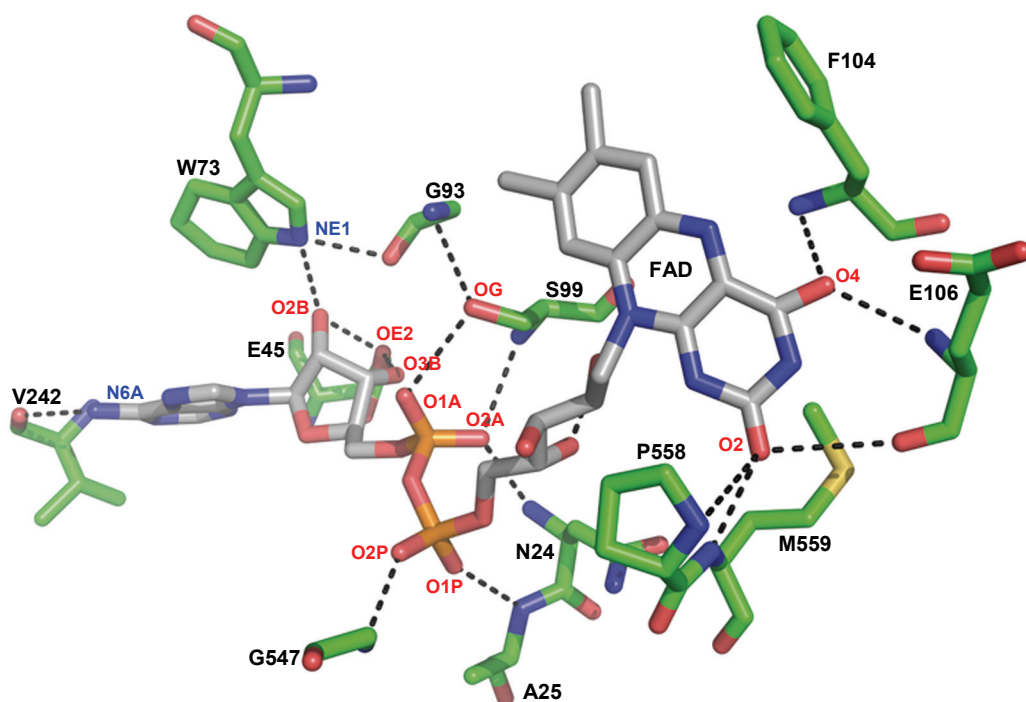


Fig. 3.40. Interacciones polares hipotéticas (---) en la AAO del anamorfo de *B. adusta* entre el FAD (gris) y los residuos de su entorno (verde). Determinadas con *PyMOL* v0.99.

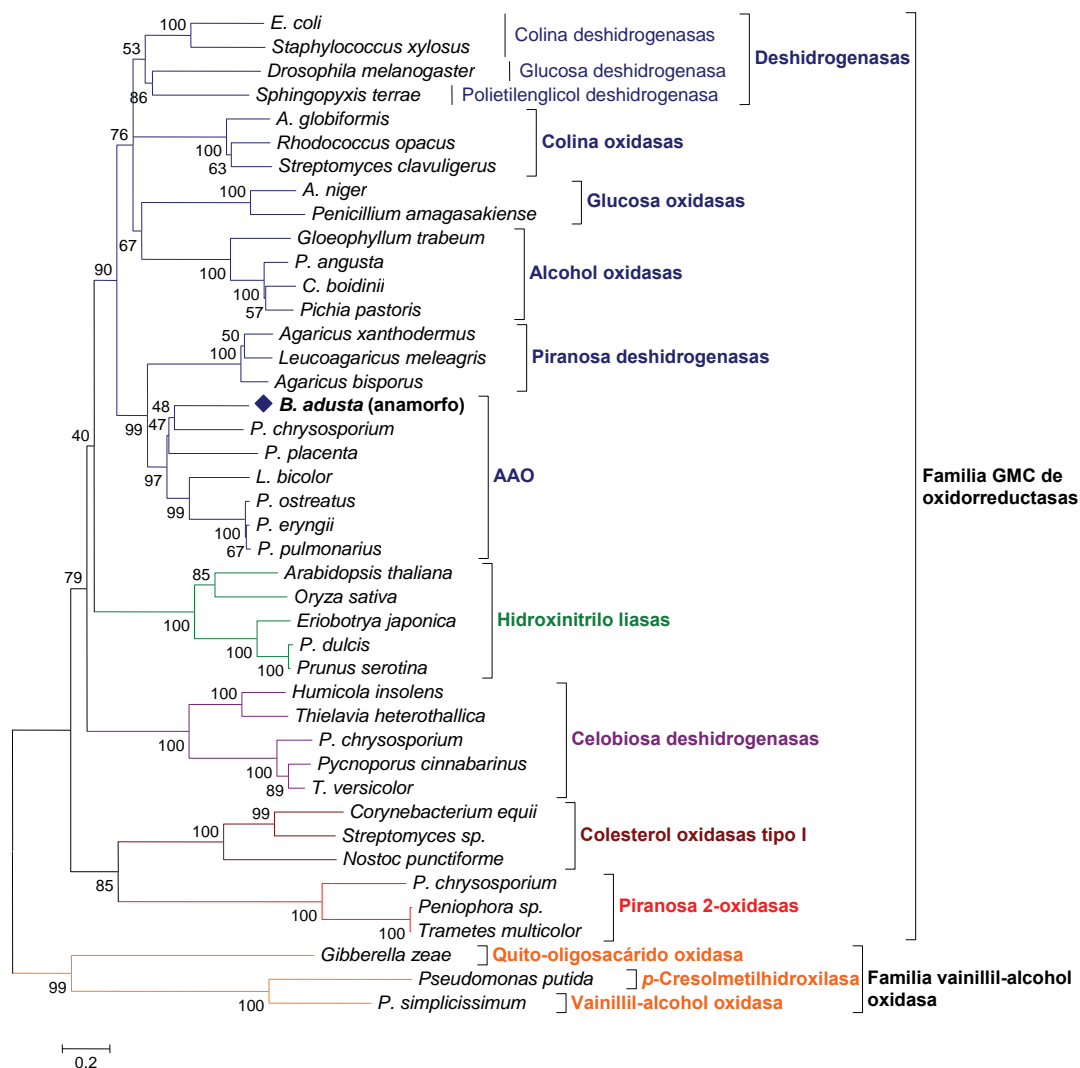


Fig. 3.41. Relaciones evolutivas entre 39 enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas y 3 de la familia de la vainillil-alcohol oxidasas. Se utilizó el método de *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987) y se muestran los valores de *bootstrap* (1000 réplicas) (Felsenstein, 1985). El análisis se realizó con las secuencias aminoacídicas y el programa *MEGA4* (Tamura *et al.*, 2007).

3.5. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MnP DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

3.5.1. Etapas de purificación

Se purificaron dos MnP secretadas por el anamorfo de *B. adusta*, que se denominaron MnP1 y MnP2. Como se ha mencionado anteriormente (**Apartado 3.3.1**), se utilizaron cultivos con 7 días de incubación (200 ml/matraz, 150 rpm, 28 °C) en medio Kimura con 500 μ M de MnSO_4 , que es la concentración óptima de este compuesto para inducir la producción de estas MnP (**Fig. 3.6D**). El líquido de cultivo se separó del micelio filtrando al vacío y se concentró y dializó utilizando un equipo de ultrafiltración tangencial. El proceso de purificación incluyó tres pasos cromatográficos, con un rendimiento final de 12,6 y 11,2% para la MnP1 y la MnP2, respectivamente (referido a actividad sobre MnSO_4). Este proceso se monitorizó a 280 nm para detectar las proteínas totales y a 410 nm para detectar a las hemoproteínas. Además, se valoró la actividad sobre MnSO_4 en las fracciones con absorbancia a 410 nm. Como se observa en la **Fig. 3.16A**, la primera cromatografía de intercambio iónico permitió separar las fracciones con actividad AAO de las que presentaban actividad MnP. Éstas últimas se concentraron y dializaron con una célula de ultrafiltración y a continuación se utilizó una columna de intercambio iónico más resolutive y un gradiente suave de NaCl (50-100 mM, 43 min) para separar la MnP1 de la MnP2 (**Fig. 3.42A**). Las fracciones con MnP1 y MnP2 se recogieron separadamente y se concentraron por ultrafiltración. Finalmente, ambas isoenzimas se aplicaron en una columna de exclusión molecular (**Fig. 3.42B y C**). Tras este último paso de purificación, la relación A_{408}/A_{280} de la MnP1 y la MnP2 fue próxima a 4 y se observó una única banda mediante SDS-PAGE e isoelectroenfoque en cada muestra (**Fig. 3.43**). La actividad específica de la MnP1 y la MnP2 purificadas, fue de 129,4 y 177,6 U/mg, respectivamente (utilizando MnSO_4 como sustrato). Para monitorizar el proceso de purificación completo, se realizó una electroforesis con muestras recogidas después de cada cromatografía y del crudo enzimático. Los geles obtenidos se incluyen en la **Fig. 3.43**.

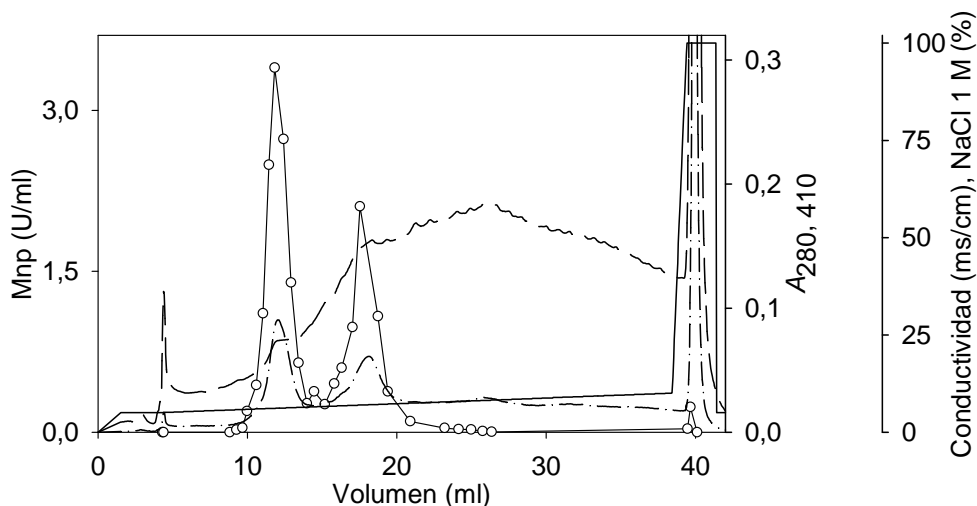
3.5.2. Características fisicoquímicas

3.5.2.1. Masa molecular

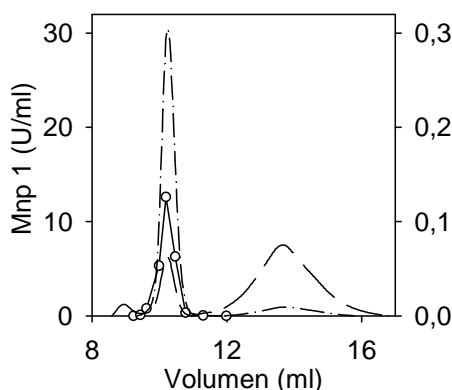
La masa molecular aproximada de las MnP, estimada por SDS-PAGE, es de 41,754 kDa (**Fig. 3.43A**). Se calculó un valor similar mediante cromatografía de exclusión molecular interpolando en una recta de calibrado (47,3 y 47,4 kDa para la MnP1 y la MnP2, respectivamente), por lo que se confirmó la naturaleza

monomérica de estas hemoproteínas. Los valores exactos, determinados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, son 37,396 y 37,404 kDa para la MnP1 y la MnP2, respectivamente.

A



B



C

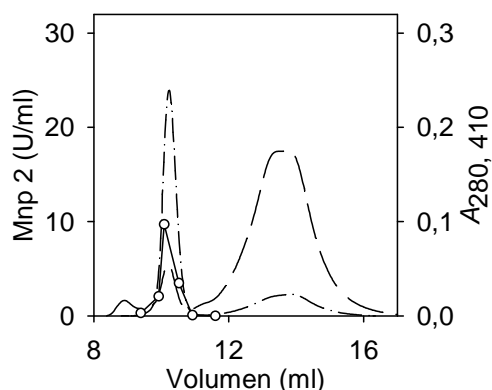


Fig. 3.42. Perfiles cromatográficos obtenidos durante la purificación de las MnP secretadas por el anamorfo de *B. adusta*. A) Cromatografía en *Mono-Q* de las fracciones con actividad MnP recogidas tras *HiTrap-Q*. B y C) Cromatografía en *Superdex-75* del último paso de purificación de la MnP1 y la MnP2, respectivamente. Se muestra la actividad MnP (\circ), la A_{280} (---), la A_{410} (-.-) y el gradiente de NaCl teórico (—).

3.5.2.2. Punto isoeléctrico

La **Fig. 3.43B** muestra el gel de poliácridamida utilizado para determinar el pI de la MnP1 y la MnP2. Para ello, se midió el gradiente lineal de pH formado en el

gel y se interpoló en la correspondiente recta de calibrado (utilizando el rango de pH 3,0-6,0). Los pI obtenidos para la MnP1 y la MnP2 fueron de 4,024 y 3,713, respectivamente. La diferencia entre estos valores posibilitó la separación de las dos isoenzimas utilizando una columna de intercambio iónico y un gradiente suave de NaCl (**Fig. 3.42A**).

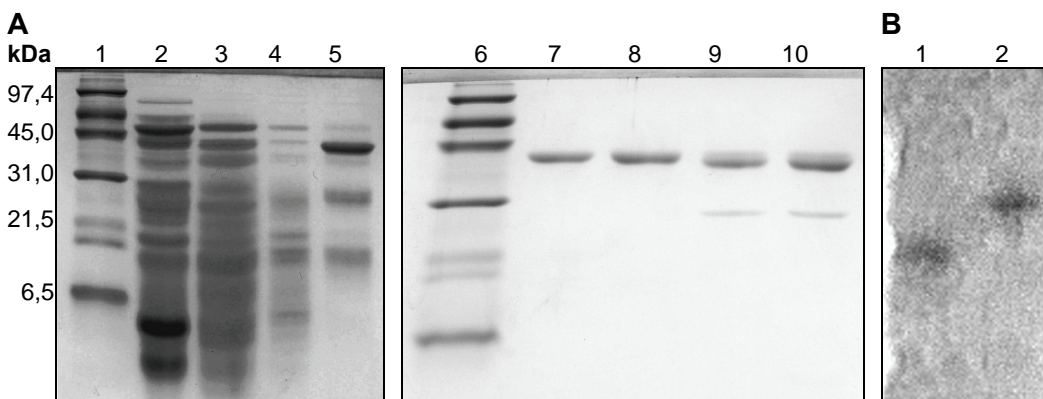


Fig. 3.43. SDS-PAGE (A) y pI (B) con diferentes alícuotas obtenidas durante el proceso de purificación de las MnP y tras su desglicosilación con Endo H. A) Muestras: 1 y 6, marcadores de masa molecular; 2, crudo enzimático; 3, *HiTrap-Q*; 4, *Mono-Q* MnP1; 5, *Mono-Q* MnP2; 7, *Superdex-75* MnP1; 8, *Superdex-75* MnP2; 9, *Superdex-75* MnP1 desglicosilada; y 10, *Superdex-75* MnP2 desglicosilada. La segunda banda de las muestras 9 y 10 corresponde a la Endo H. B) Muestras: 1, *Superdex-75* MnP1; y 2, *Superdex-75* MnP2. Los tres geles se revelaron con una solución de azul brillante Coomassie R-250.

3.5.2.3. Grado de glicosilación

La masa molecular de las MnP desglicosiladas es aproximadamente 38,781 kDa, según su movilidad electroforética en condiciones desnaturalizantes (**Fig. 3.43A**). Por comparación con muestras no tratadas con Endo H, se determinó que las MnP tienen aproximadamente un 7,1% de carbohidratos unidos mediante enlace N-glicosídico.

3.5.2.4. Secuencia aminoacídica del N-terminal

Se secuenció el extremo N-terminal de la MnP1 y la MnP2 mediante degradación de Edman (20 y 21 aminoácidos, respectivamente). Las secuencias obtenidas son idénticas y similares a las de otras peroxidases. Utilizando el programa *BLASTP*, la homología más elevada se obtuvo con la MnP1 de *Phlebia* sp. MG60 y con una LiP de *T. versicolor* (66% de identidad de secuencia). También presentaron alta homología con una peroxidasa de *Ceriporiopsis* sp. MD-1, con una MnP de *Ceriporiopsis rivulosa* (Berk. & M. A. Curtis) Gilb. & Ryvarden, con una LiP de *Phlebia radiata* Fr. y con una LiP de la cepa de *B.*

adusta IFO 5307 (identidad de secuencia de 61, 66, 61 y 68%, respectivamente). El alineamiento de la **Fig. 3.44** incluye a éstas y a otras peroxidadas de interés.

MnP CERRI	VTCPDGVNTATNAACCP LFAV
MnP2 aBJAD	VTXPDGKNTASNAAXXLFXV
LiP PHLRA	VACPDGINTATNAACCALFPV
LiP PHACH	VACPDGVETASNAACCAWFPV
VP BJ B33/3	VACPDGVNTATNAACCALFAV
MnP1 PHL MG60	VACPDGKNTATNAACCSLFAV
LiP7 TRAVE	VACPDGKNTATNAACCSLFAV
P CER MD-1	VACPDGKNTATNAACCALFAI
LiP BJAD IFO530	VACPDGKNTA INAACCSLFTA
VP2 PLEER	ATCDDGR TTA-NAACCLFPI

Fig. 3.44. Alineamiento del extremo N-terminal de la MnP2 del anamorfo de *B. adusta* (aBJAD) y de otras peroxidadas fúngicas. MnP CERRI, MnP de *C. rivulosa* (GenBank: ABB83813.1); LiP PHLRA, LiP de *P. radiata* (GenBank: AAW59419.1); LiP PHACH, LiP de *P. chrysosporium* (GenBank: CAA33621.1); VP BJ B33/3, VP de *Bjerkandera* sp. B33/3 (GenBank: AAO47909.1); MnP1 PHL MG60, MnP1 de *Phlebia* sp. MG60 (GenBank: BAG12560.1); LiP7 TRAVE, LiP7 de *T. versicolor* (GenBank: CAA83147.1); P CER MD-1, peroxidada de *Ceriporiopsis* sp. MD-1 (GenBank: BAG49629.1); LiP BJAD IFO5307, LiP de *B. adusta* IFO 5307 (PRF: 444058); y VP2 PLEER, VP2 de *P. eryngii* (Swiss-Prot: O94753.1). Alineamiento *ClustalW* realizado con *The Biology WorkBench*. Se indican los residuos completamente conservados (fondo negro), los idénticos (fondo gris oscuro) y los similares (fondo gris claro).

3.5.3. Espectro de absorción y coeficiente de extinción molar

Los espectros de absorción UV-Vis de las MnP en estado de reposo se muestran en la **Fig. 3.45**. Las dos isoenzimas presentan los mismos máximos de absorción, que son similares a los de otras hemoproteínas (Iizuka y Yonetani, 1970). Concretamente, destaca un máximo en la banda de Soret a 408 nm y dos bandas de transferencia de carga a 506 y 638 nm (CT1 y CT2, respectivamente). Además, los espectros de ambas MnP podrían incluir bandas α y β muy débiles (próximas a 570 y 540 nm, respectivamente). Utilizando la ecuación de Lambert-Beer, se determinó un ϵ_{408} de 115,349 y 122,603 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para la MnP1 y la MnP2, respectivamente.

3.5.4. Especificidad de sustrato

Tras la purificación de las peroxidadas del anamorfo de *B. adusta*, en las condiciones descritas anteriormente, se llevó a cabo un estudio de su especificidad de sustrato (**Tabla 3.13**). Los resultados obtenidos indicaron que ambas isoenzimas son MnP, similares a las de *P. chrysosporium* y otros basidiomicetos ligninolíticos (Hofrichter, 2002). Así, la MnP1 y la MnP2 del anamorfo de *B. adusta* presentaron los valores más elevados de eficiencia catalítica utilizando MnSO_4 como sustrato (621 y 1125 $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$, respectivamente). Además, estas peroxidadas no oxidaron el alcohol veratrílico

ni el RB5, compuestos de alto potencial redox que son sustratos de las VP (Martínez *et al.*, 1996; Palma *et al.*, 2000). Como se ha descrito en otras MnP (Palma *et al.*, 2000), las peroxidasa del anamorfo de *B. adusta* presentaron valores de eficiencia catalítica muy reducidos utilizando ABTS y DMP como sustratos ($0,08\text{-}20\text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$). Esto se debe a la baja afinidad de ambas MnP por estos compuestos, sobre todo en el caso del DMP, puesto que los valores de k_{cat} son del mismo orden que los obtenidos utilizando MnSO_4 como sustrato. Finalmente, cabe mencionar que los valores de K_{m} de la MnP2 son inferiores a los de la MnP1 con ambos compuestos.

Tabla 3.13. Constantes cinéticas de las MnP con diferentes sustratos.

		K_{m} (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)
MnSO_4 (pH 5,0)	MnP 1	$0,04 \pm 0,004$	27 ± 1	$620,9 \pm 45,2$
	MnP 2	$0,05 \pm 0,003$	58 ± 1	$1124,9 \pm 57,3$
DMP (pH 3,0)	MnP 1	$614,09 \pm 305,19$	52 ± 23	$0,08 \pm 0,01$
	MnP 2	$248,73 \pm 44,87$	54 ± 7	$0,22 \pm 0,01$
ABTS (pH 3,5)	MnP 1	$9,67 \pm 2,20$	71 ± 11	$7,38 \pm 0,60$
	MnP 2	$2,73 \pm 0,26$	55 ± 2	$20,31 \pm 1,18$

Se utilizó tampón tartrato 100 mM y H_2O_2 0,1 mM. Los datos experimentales se ajustaron a la función hiperbólica de Michaelis-Menten. Los valores obtenidos con el DMP son sólo orientativos, debido a que la solubilidad de este compuesto en el tampón utilizado limita el número de concentraciones testadas para el ensayo y al elevado error obtenido.

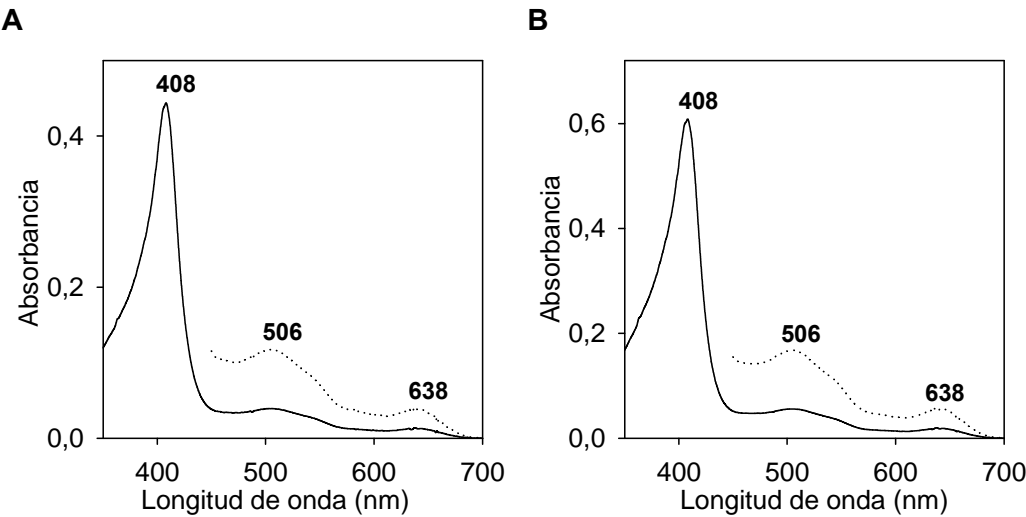


Fig. 3.45. Espectros de absorción de la MnP1 (A) y la MnP2 (B) del anamorfo de *B. adusta*. Se utilizaron soluciones $3,8\text{ }\mu\text{M}$ de MnP1 y $4,9\text{ }\mu\text{M}$ de MnP2 en tampón tartrato 10 mM pH 5,0. La línea punteada corresponde a un detalle del rango 450-700 nm en escala 3x.

4. DISCUSIÓN

4.1. IDENTIFICACIÓN DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

El hongo aislado del CD biodeteriorado, encontrado en Belice, se incluyó inicialmente en el género *Geotrichum* (García-Guinea *et al.*, 2001). Esta identificación preliminar se basó en diferentes características morfológicas, macroscópicas y microscópicas, observadas en esta especie fúngica: **i)** colonias blancas con micelio aéreo y de crecimiento rápido; **ii)** hifas septadas, hialinas, sin fibulas y con ramificación dicotómica; y **iii)** producción de artroconidios con forma de barril y ausencia de formas de reproducción sexual.

Con objeto de completar la identificación del hongo aislado del CD, en este trabajo se secuenciaron las regiones ITS1, 5,8S, e ITS2 de su ADN_r, utilizando los *primers* universales ITS1 e ITS4. La secuencia obtenida (604 pb, *GenBank*: EF441742.1) presentó un 99% de identidad con *T. cucumeris*, dos basidiomicetos no identificados y varios aislados de *Bjerkandera* spp. y *B. adusta* (Romero *et al.*, 2007). *T. cucumeris* (teleomorfo de *Rhizoctonia solani* J. G. Kühn) es un patógeno de plantas que, en medio sólido con patata y glucosa, desarrolla colonias con una tonalidad que varía entre beis y negra, carece de esporas asexuales, produce basidiosporas y forma sobre la superficie del cultivo esclerocios con formas irregulares y de color marrón (Sneh *et al.*, 1991). Estas características no se observan en el hongo aislado del CD, utilizando diferentes medios de cultivo. Sin embargo, su morfología es similar a la de *B. adusta*, en la que se han descrito estados conidiales similares a *Geotrichum* (Barnett y Hunter, 1998). Así, varios aislados de *Bjerkandera* spp. han sido identificados inicialmente como hongos de tipo *Geotrichum* (Wirsal *et al.*, 2001; Kornilowicz-Kowalska *et al.*, 2006). Por tanto, en base a los estudios morfológicos y moleculares realizados, se puede concluir que el hongo aislado del CD es un anamorfo del basidiomiceto *B. adusta*.

Además, cabe destacar que el estudio de las enzimas ligninolíticas, secretadas por este hongo, avala la identificación realizada. Esta especie fúngica produce, en cultivos líquidos con glucosa, peptona y MnSO₄, una AAO y peroxidasas dependientes de Mn y ambos tipos de oxidorreductasas han sido descritos previamente en diferentes especies de *Bjerkandera* (de Jong *et al.*, 1994a; Muheim *et al.*, 1990; Mester y Field, 1997; Wang *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2005; Heinfling *et al.*, 1998a). En algunas cepas de este género se han detectado además niveles bajos de actividad lacasa, como en *B. adusta* R59 en presencia de ácidos húmicos de lignito o de chernozem (Belcarz *et al.*, 2005). Sin embargo, esta fenoloxidasas no ha sido detectada en la mayoría de los estudios realizados en distintas especies de *Bjerkandera*, ni tampoco en el hongo aislado del CD, en ninguna de las condiciones estudiadas.

4.2. DEGRADACIÓN DE CD POR EL ANAMORFO DE *B. adusta*

Los estudios realizados han demostrado que el anamorfo de *B. adusta* es capaz de colonizar *in vitro* diferentes tipos de CD incubados en cultivos sólidos (28 °C y 100% de humedad). Esto confirma que es el organismo responsable del deterioro observado en el CD de Belice. Como se detallará en los siguientes apartados, el proceso de degradación es más rápido en los CD-R que en los CD-A y la capa de laca y la etiqueta son muy eficaces para evitar la colonización de ambos tipos de CD. Una elevada humedad y temperatura parecen ser los factores que favorecen la degradación de los CD y una conservación adecuada puede prevenir su deterioro.

A pesar de que la capacidad para almacenar información varía considerablemente según el tipo de disco óptico (CD, DVD o BD), todos presentan una composición y una estructura similar. Esto sugiere que las especies fúngicas capaces de deteriorar CD-A y CD-R pueden afectar a otros tipos de discos. Además, el espesor de la capa de policarbonato que atraviesa el láser en los CD es superior al de los DVD y los BD (1,2, 0,6 y 0,1 mm, respectivamente) y, como consecuencia, estos últimos son más frágiles y susceptibles a las ralladuras. Sin embargo, se han desarrollado para los BD sustancias protectoras (p. ej., *Durabis*TM) que otorgan una protección adicional. A continuación, se analizarán algunos aspectos relacionados con la biodegradación de los principales componentes de estas unidades de almacenamiento óptico.

4.2.1. Colorantes

Los colorantes y pigmentos sintéticos presentan una amplia variedad de aplicaciones industriales (p. ej., textil, papelera, alimenticia, farmacéutica, cosmética). Aproximadamente un 10% de la producción mundial de estos compuestos ($\sim 7 \times 10^5$ t) se libera en los efluentes industriales y causa graves problemas medioambientales (Rodríguez, 2009). Para el tratamiento de estos residuos, el potencial del sistema ligninolítico de los basidiomicetos de podredumbre blanca está avalado por numerosos estudios (Wesenberg *et al.*, 2003; Husain, 2006). Así, se ha demostrado inequívocamente la capacidad de las peroxidasas y las lacasas fúngicas para degradar colorantes de diversa estructura química (Camarero *et al.*, 2005; Husain, 2010; Zouari-Mechichi *et al.*, 2006). Además, estas oxidorreductasas se han descrito en actinomicetos del género *Streptomyces* y también se ha comprobado su eficacia sobre los colorantes (Burke y Crawford, 1998; Dube *et al.*, 2008; Molina-Guijarro *et al.*, 2009). Además de las enzimas mencionadas, el OH \cdot es otro elemento clave del sistema ligninolítico que puede participar en la degradación de colorantes. Como se ha

mencionado anteriormente, diferentes oxidorreductasas fúngicas (p. ej., AAO, glioxal oxidasa) reducen directamente el O_2 a H_2O_2 , y ésta, en presencia de Fe^{2+} , participa en la producción de $OH\cdot$ mediante la reacción de Fenton. Las lacasas y las peroxidasas también participan en la producción de $OH\cdot$ a través de ciclos redox de quinonas (**Fig. 1.3**) y recientemente se ha comprobado, en diferentes basidiomicetos de podredumbre blanca, la eficacia de la producción de este radical para la oxidación de compuestos contaminantes, como el colorante azo RB5 (Gómez-Toribio *et al.*, 2009b; Gómez-Toribio *et al.*, 2009a). La producción de $OH\cdot$ mediante diferentes métodos fisicoquímicos, basados en la reacción de Fenton, también ha servido para demostrar su aplicabilidad para la degradación de colorantes de diversa estructura química (Xu *et al.*, 2004).

Actualmente, se producen 10000 tipos diferentes de colorantes y pigmentos, que tienen diversas estructuras químicas y aplicaciones tecnológicas (Rodríguez, 2009). Numerosos estudios previos han demostrado la habilidad de diferentes cepas de *Bjerkandera* para degradar varios de estos compuestos (Heinfling *et al.*, 1998b; Heinfling *et al.*, 1997; Heinfling-Weidtmann *et al.*, 2001; Swamy y Ramsay, 1999; Moreira *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2001; Tinoco *et al.*, 2007; Mohorcic *et al.*, 2006) y el anamorfo de *B. adusta*, objeto de este estudio, también es capaz de degradar en cultivo sólido distintos colorantes con grupos cromóforos variados (azo, diazo, indigoide, ftalocianina, antraquinónico, triarilmetano y heterocíclico). En todos los casos, se observó la decoloración progresiva del medio de cultivo, pero el micelio conservó su color blanco durante todo el tiempo de incubación. Este hecho sugiere que no se está produciendo adsorción de los colorantes en el micelio y que el hongo puede degradar/transformar los grupos cromóforos de los distintos colorantes. La velocidad de decoloración de los colorantes en los cultivos del anamorfo de *B. adusta* fue distinta según su estructura química. Este hongo actuó más rápidamente sobre uno de los colorantes de tipo azo, el indigoide, el diazo y el antraquinónico, mientras que los compuestos más recalcitrantes fueron el heterocíclico y el de tipo ftalocianina.

Los colorantes de tipo azo son los más utilizados industrialmente (50-70% de la producción anual) (Stolz, 2001). Los primeros estudios que revelaron el potencial de los hongos ligninolíticos para degradar este tipo de compuestos se realizaron con *P. chrysosporium* (Cripps *et al.*, 1990) y posteriormente se demostró que este hongo es capaz incluso de mineralizar estos colorantes (Paszczynski *et al.*, 1992; Spadaro *et al.*, 1992). Desde entonces, se han descrito otros basidiomicetos de podredumbre blanca que también actúan sobre los colorantes azo, en algunos casos incluso más eficazmente como *Bjerkandera* spp. y *Trametes* spp. (Heinfling *et al.*, 1997). El anamorfo de *B. adusta*, aislado

del CD, decoloró rápidamente el compuesto azo *Acid orange 52* y RB5, pero los otros colorantes de este tipo fueron más recalcitrantes (*Reactive violet 5* y *Acid orange 7*). Las MnP secretadas por esta especie fúngica no presentaron actividad sobre el RB5 (**Apartado 4.4.3**) y Heinfling *et al.* (1998b) demostraron que este colorante tampoco es oxidado por el Mn^{3+} producido por peroxidasas ligninolíticas. Por tanto, en el anamorfo de *B. adusta* la decoloración del RB5 podría deberse al $OH\cdot$ formado mediante la reacción de Fenton. El H_2O_2 , requerida en esta reacción, podría ser producida por la AAO de esta especie fúngica o mediante ciclos redox de quinonas con la participación de las peroxidasas que produce. En cuanto a los colorantes azo *Reactive violet 5* y *Acid orange 7*, otras cepas de *Bjerkandera* spp. oxidan estos compuestos en presencia y ausencia de Mn^{2+} (Heinfling *et al.*, 1998b; Moreira *et al.*, 2000). Estos estudios sugieren que en el caso del anamorfo de *B. adusta* podría suceder lo mismo.

El hongo aislado del CD también degradó rápidamente el colorante antraquinónico *Reactive blue 19* (~ 95-100% a los 8 días). Para la degradación de este tipo de compuestos, se ha descrito recientemente que son muy eficaces las DyP (Sugano *et al.*, 2007), pero la producción de este nuevo tipo de peroxidasas no se ha estudiado en los cultivos del anamorfo de *B. adusta* ni en ninguna otra cepa de este género. Sin embargo, se ha descrito que la VP de *B. adusta* UAMH 8258 oxida el *Reactive blue 19* más eficazmente en presencia de Mn^{2+} que en ausencia de este catión (Tinoco *et al.*, 2007). Esto sugiere que las MnP del anamorfo de *B. adusta* podrían oxidar este colorante mediante la producción de Mn^{3+} , aunque esta especie fúngica también podría producir DyP. Finalmente cabe mencionar, en relación a este tipo de colorantes, que el anamorfo de *B. adusta*, como se ha descrito en *B. adusta* R59 (Belcarz *et al.*, 2005), podría ser eficaz en la destoxificación de efluentes industriales con daunorubicina, un antibiótico antitumoral estructuralmente relacionado con los colorantes antraquinónicos.

Como se mencionó anteriormente, el *Azure B* y la sal tetrasódica de la tetrasulfonatoftalocianina de níquel (II) (colorantes de tipo heterocíclico y ftalocianina, respectivamente) también fueron degradados parcialmente por el anamorfo de *B. adusta* en cultivos sólidos, aunque fueron los colorantes más recalcitrantes. Además, esta especie fúngica decoloró la capa de colorante de tipo ftalocianina de los CD-R. Estudios previos revelaron que las peroxidasas de *B. adusta* DSM 11310 actúan sobre los colorantes de tipo ftalocianina produciendo sulfoftalimida (Heinfling-Weidtmann *et al.*, 2001). En cuanto al *Azure B*, se ha descrito que este compuesto puede ser decolorado por las lacasas (en presencia de mediadores) y por las LiP, pero no por las MnP (Camarero *et al.*, 2005; Archibald, 1992). Como el anamorfo de *B. adusta* no produjo lacasa ni LiP en

las condiciones ensayadas, la degradación de *Azure B* en los cultivos de esta especie podría deberse a la formación de OH \cdot .

Los resultados expuestos en este apartado indican que el anamorfo de *B. adusta* presenta un gran potencial para la degradación de colorantes y otros xenobióticos similares. Además, la capacidad del hongo objeto de estudio para decolorar colorantes de diversa estructura química facilita su aplicación en el tratamiento de efluentes textiles, que generalmente contienen mezclas complejas de estos compuestos. Sin embargo, para confirmar la aplicabilidad de este hongo son necesarios estudios complementarios que profundicen en los mecanismos de decoloración y que permitan identificar los productos de degradación y su posible toxicidad, así como optimizar las condiciones del proceso.

4.2.2. Metales

Los hongos de podredumbre blanca requieren trazas de algunos metales para su metabolismo (p. ej., Cd, Mn, Zn) pero generalmente los metales son tóxicos a elevadas concentraciones para estos organismos (Baldrian, 2003). Desde un punto de vista medioambiental, la tolerancia de las diferentes especies fúngicas a los metales es un factor clave para su aplicación en la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes. Así, los efluentes textiles con colorantes contienen generalmente metales y en los suelos contaminados (p. ej., con hidrocarburos aromáticos policíclicos o con pesticidas) también son frecuentes.

Varios estudios se han centrado en el efecto de diferentes metales en el sistema ligninolítico de los hongos de podredumbre blanca. Por ejemplo, se ha descrito un efecto positivo del Cu, Fe, Mn, Pb y Zn en los niveles de producción de la lacasa de *P. ostreatus* (Baldrian *et al.*, 2005). En otros estudios, se ha comprobado que la Ag inhibe a la AAO de *P. eryngii* (Guillén *et al.*, 1990) y también a la piranosa oxidasa de *T. versicolor* (Machida y Nakanishi, 1984). Recientemente, Catal *et al.* (2008) describieron que concentraciones bajas de Se inducen la producción de MnP en *B. adusta* pero elevados niveles de este metal tienen un efecto negativo en la producción de esta enzima. Como se detallará posteriormente (**Apartados 4.3.1 y 4.4.1**), las concentraciones de Mn utilizadas en los cultivos del anamorfo de *B. adusta* (100-1000 μ M) no influyeron en su crecimiento y estimularon la producción de MnP, pero las concentraciones superiores a 500 μ M tuvieron un ligero efecto negativo en los niveles de producción de AAO.

Los cultivos sólidos y líquidos del anamorfo de *B. adusta*, se suplementaron con fragmentos de CD-A obtenidos tras la segunda y la tercera etapa de fabricación (policarbonato sólo con Al o con Al y laca, respectivamente). En los fragmentos de CD sin laca (1/8) incubados en cultivos sólidos, el Al se movilizó

progresivamente desde los bordes y se eliminó, prácticamente en su totalidad, a los 2 meses de incubación. Sin embargo, los CD recubiertos de laca presentaban sólo los primeros signos de degradación tras el mismo tiempo de incubación, en las mismas condiciones. En cuanto a los cultivos líquidos suplementados con fragmentos más pequeños de CD, los análisis de ICP-OES revelaron que, a los 20 días de incubación, la mayor parte del Al de los fragmentos sin laca se había distribuido entre el micelio y el líquido de cultivo (~ 90-100%). Este porcentaje fue considerablemente inferior en los fragmentos recubiertos con laca (~ 30%). Además de CD-A, se incubaron también CD-R comerciales en cultivos sólidos del anamorfo de *B. adusta* y en éstos se observó el deterioro progresivo de la capa de Ag en las regiones sin etiqueta y laca. Estos resultados confirman la eficacia de la capa de laca para proteger los CD-A y los CD-R de la degradación.

En relación con el mecanismo de movilización de estos metales, cabe destacar que el anamorfo de *B. adusta* secreta diferentes ácidos orgánicos en cultivos líquidos, en presencia y ausencia de fragmentos de CD (acético, cítrico y oxálico, **Apartado 4.4.1**). Estos ácidos se complejan con los metales y los inmovilizan y por consiguiente disminuyen su biodisponibilidad. Así, se ha descrito la formación de cristales de oxalato, con diferentes metales, en varios basidiomicetos de podredumbre blanca, como *B. fumosa*, *P. radiata* y *T. versicolor* (Jarosz-Wilkolazka y Gadd, 2003). La formación de estos quelatos puede contribuir a la tolerancia de estos organismos a ambientes contaminados con metales. La presencia de Al en el micelio del anamorfo de *B. adusta*, tras su incubación en presencia de CD-A, es consistente con que los hongos presentan otros mecanismos de destoxificación, como la adsorción de metales en la pared celular o la quelación intracelular (Bellion *et al.*, 2006). En relación con esto último, se ha descrito que el basidiomiceto *L. bicolor* acumula Al en el interior de vacuolas unido a polifosfatos (Martin *et al.*, 1994).

La recuperación de los metales de los CD desechados, no es rentable económicamente y supone un elevado gasto energético, debido a que se utilizan cantidades muy reducidas (gramos por tonelada de discos). Sin embargo, el reciclado del policarbonato de BPA es económicamente rentable y reduce su impacto medioambiental (**Apartado 4.2.3**). Este proceso implica la eliminación previa de las capas depositadas sobre este polímero sintético (metal, colorante, laca y etiqueta). Para esto último, se han diseñado diferentes métodos químicos y mecánicos (p. ej., tratamiento con soluciones alcalinas a altas temperaturas, filtración del plástico fundido, abrasión mecánica), pero todas las técnicas tienen algunas desventajas en términos medioambientales y energéticos (Zevenhoven y Saeed, 2002). Una alternativa, que no presenta estos problemas, podría ser la

utilización del anamorfo de *B. adusta*, o de otras especies fúngicas similares, si se optimizaran las condiciones de tratamiento de los CD.

4.2.3. Policarbonato

En los últimos 60 años, la producción de plásticos ha incrementado considerablemente (Hopewell *et al.*, 2009). Para reducir su gran impacto medioambiental son necesarios sistemas eficaces de biodegradación o de reciclado de estos polímeros sintéticos (Oehlmann *et al.*, 2009). En este estudio, se ha examinado la biodegradabilidad del policarbonato sintetizado con BPA, utilizando el anamorfo de *B. adusta*. Este poliéster, además de ser el material básico de los discos ópticos, se utiliza para fabricar una amplia gama de productos (p. ej., carcasas de equipos electrónicos, techos, cascos de seguridad, faros de automóviles, botellas).

Los estudios realizados mediante SEM, con fragmentos de CD-A y CD-R incubados en cultivos líquidos del anamorfo de *B. adusta*, revelaron hifas adheridas a la superficie del policarbonato y evidencias inequívocas de su degradación. Así, en los CD-A compuestos únicamente de policarbonato grabado, los *pits* estaban deteriorados tras 1 mes de incubación y no se observaban a los 2 meses. En los CD con capas protectoras adicionales (Al, laca y etiqueta), el policarbonato también presentó signos de biodegradación aunque el proceso fue más lento. Esto concuerda con los resultados expuestos anteriormente, que indicaban la eficacia de la laca para proteger los demás componentes de los CD.

Los dos mecanismos principales de biodegradación de polímeros son oxidación e hidrólisis. Estas reacciones pueden estar catalizadas por enzimas o implicar la participación de ciertos metabolitos (p. ej., peróxidos). Sivalingam y Madras (2004) hidrolizaron policarbonato de BPA utilizando diferentes lipasas. En los cultivos del anamorfo de *B. adusta* se detectaron niveles bajos de actividad esterasa, utilizando *p*NPB como sustrato. Esta actividad se indujo con aceite de oliva, como se ha descrito en otras especies fúngicas (Calero-Rueda *et al.*, 2002). En el caso de *B. adusta* R59, la actividad lipasa se indujo con ácidos húmicos de lignito, probablemente debido a la presencia de lípidos complejados con las sustancias húmicas (Belcarz *et al.*, 2005). Estudios adicionales, con distintos inductores de este tipo de enzimas, se están llevando a cabo actualmente para determinar el posible papel de la esterasa del anamorfo de *B. adusta* en la degradación de policarbonato.

En cuanto al reciclaje de los residuos de policarbonato, una de las estrategias estudiadas consiste en despolimerizarlos para utilizar los monómeros resultantes en la síntesis de nuevos polímeros (Lin *et al.*, 2007). En los cultivos del

anamorfo de *B. adusta*, en presencia de policarbonato, se detectó BPA a los 30 días de incubación. Este compuesto se utiliza frecuentemente para la síntesis química de plásticos (policarbonatos y poliepóxidos), a pesar de que es un disruptor endocrino (Oehlmann *et al.*, 2009). Varias especies de basidiomicetos son capaces de degradar BPA, como *P. ostreatus* (Hirano *et al.*, 2000; Tsutsumi *et al.*, 2001), *C. cinerea* (Sakurai *et al.*, 2001), *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. (Lee *et al.*, 2005), *Heterobasidion insulare* (Murrill) Ryvarden (Lee *et al.*, 2005) y *B. adusta* 606/93 (Cajthaml *et al.*, 2009). En algunas de estas especies, se ha demostrado el papel de las peroxidasas en la degradación de BPA y se han identificado diversos metabolitos (p. ej., fenol, *p*-isopropenilfenol, *p*-isopropilfenol, hexestrol) o productos de polimerización resultantes del proceso. En el caso del anamorfo de *B. adusta*, son necesarios estudios adicionales para determinar el papel de sus peroxidasas en la degradación de BPA. Sin embargo, la degradación de este compuesto, en los cultivos fúngicos, también podría tener lugar mediante especies activas de O₂, producidas a partir de H₂O₂ (Sajiki, 2001; Sajiki y Yonekubo, 2002). Estudios complementarios con el anamorfo de *B. adusta* ayudarán a determinar su mecanismo para degradar policarbonato, así como su potencial para metabolizar BPA.

4.3. AAO DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

4.3.1. Producción, purificación y caracterización fisicoquímica

En 1959, Farmer *et al.* detectaron una oxidasa de alcoholes aromáticos en el líquido de cultivo de *T. versicolor*. Desde entonces, han sido purificadas y caracterizadas varias flavoenzimas similares producidas por los basidiomicetos *Pleurotus* spp., *Bjerkandera* spp., *P. chrysosporium* y *T. cucumeris* y los ascomicetos *F. solani*, *B. cinerea* y *A. terreus* (Tabla 4.1). Entre las diferentes especies, varía la composición de los medios de cultivo, los niveles de producción y los rendimientos de los procesos de purificación. Así, se han utilizado como fuentes de carbono diferentes concentraciones de glucosa, galactosa, *n*-hexadecano y extracto de malta y, como fuentes de nitrógeno, tartrato amónico, peptona y aminoácidos. Hasta el momento, los niveles de producción más elevados se han descrito en *P. pulmonarius* (2,5 U/ml sobre veratrílico) utilizando un medio de cultivo con glucosa, peptona y extracto de levadura (Kimura *et al.*, 1990). Además, la AAO secretada por esta especie se purificó en un único paso cromatográfico con un 90% de rendimiento (Varela *et al.*, 2000a).

Teniendo en cuenta estos estudios, el anamorfo de *B. adusta*, aislado del CD, se cultivó en el mismo medio para producir y purificar la AAO. En esta especie

fúngica, los niveles detectados de actividad AAO (0,4 U/ml sobre veratrílico) no fueron tan elevados como en *P. pulmonarius*, aunque fueron comparables a los obtenidos en otras especies del género *Pleurotus* (0,1-1 U/ml sobre veratrílico) (Guillén *et al.*, 1992; Bourbonnais y Paice, 1988; Okamoto y Yanase, 2002) y considerablemente superiores a los niveles descritos en otras cepas de *Bjerkandera* spp. (0,08 U/ml sobre *p*-anisílico) (Muheim *et al.*, 1990; de Jong *et al.*, 1994a). Los máximos de producción en el anamorfo de *B. adusta* se detectaron durante la idiofase, coincidiendo con niveles basales de la fuente de carbono. Esto concuerda con lo descrito en *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *B. adusta* CBS 595.78 y *T. cucumeris* Dec1 (Varela *et al.*, 2000a; Guillén *et al.*, 1992; Muheim *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2001).

El medio utilizado para purificar la AAO del anamorfo de *B. adusta*, se suplementó con 500 μ M de MnSO_4 , con objeto de obtener del mismo crudo enzimático las peroxidasas inducibles por este compuesto. Previamente, se comprobó que esta concentración de MnSO_4 es la óptima para inducir la producción de estas hemoproteínas aunque, como se ha mencionado anteriormente, tiene un ligero efecto negativo sobre los niveles de AAO. Esto último no concuerda con los resultados obtenidos en estudios similares realizados con la AAO de *P. eryngii*, en los que se observó un efecto positivo del MnSO_4 con concentraciones superiores a 100 μ M (Martínez *et al.*, 1996). En el promotor del gen de esta AAO se encontró un elemento de respuesta a metales (MRE) que podría estar relacionado con la inducción de esta enzima por Mn (Varela *et al.*, 1999). En el caso de *Bjerkandera* sp. BOS55, se ha comprobado que el Mn inhibe la síntesis de veratrílico y de otros alcoholes arílicos que son sustratos de la AAO pero no se ha evaluado su efecto en los niveles de producción de esta flavoenzima (Mester *et al.*, 1997).

En el caso de la AAO de *P. eryngii* se utilizó como primer paso de purificación una columna de exclusión molecular (*Sephacryl S-200*) (Guillén *et al.*, 1992). Posteriormente, se utilizó también esta técnica para purificar la AAO de *P. pulmonarius* en un único paso cromatográfico (Varela *et al.*, 2000a). En ambos casos se optó por este método, a pH 3,0, tras comprobar que ambas AAO eran estables en estas condiciones y que el pH ácido favorecía que la mayoría de las proteínas de la muestra quedaran adheridas a la matriz de la columna mientras que las AAO eluían rápidamente (Guillén *et al.*, 1992). Los estudios de estabilidad, realizados con la AAO del anamorfo de *B. adusta*, revelaron que esta enzima no es estable a pH 3,0, aunque conserva su actividad a pH 4,0 al menos durante 24 horas. En este caso, como primer paso de purificación se prefirió utilizar una cromatografía de intercambio aniónico (*HiTrap-Q*) a pH 5,5. La ventaja de esta técnica, en comparación con la cromatografía de exclusión

molecular, es que permite utilizar volúmenes de muestra considerablemente superiores. A continuación, fueron necesarios dos pasos cromatográficos más para purificar a homogeneidad la AAO del anamorfo de *B. adusta* con un rendimiento final del 62,0%, uno de los más elevados descritos hasta el momento.

Tabla 4.1. Propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas de diferentes AAO fúngicas.

	M ¹ (kDa)	CH ² (%)	pI	pH óptimo	T óptima (°C)	Máx. (nm)	Referencia
(A) Ascomicetos							
<i>F. solani</i> M-13-1 ³	n. d.	n. d.	n. d.	6,4	30	n. d.	(Iwahara <i>et al.</i> , 1980)
<i>B. cinerea</i>	70 x 3	n. d.	n. d.	5,0	30	n. d.	(Goetghebeur <i>et al.</i> , 1992)
<i>A. terreus</i> MTCC 6324	13-85	0	8,3-8,5	9,0	n. d.	n. d.	(Kumar y Goswami, 2008)
(B) Basidiomicetos							
<i>T. versicolor</i> ³	n. d.	n. d.	n. d.	6,0-6,5	n. d.	n. d.	(Farmer <i>et al.</i> , 1960)
<i>P. sajor-caju</i>	71	n. d.	I: 3,8 II: 4,0	5,0	n. d.	385, 460	(Bourbonnais y Paice, 1988)
<i>B. adusta</i> CBS 595.78	78	n. d.	I: 4,25 II: 4,35	5,7	n. d.	n. d.	(Muheim <i>et al.</i> , 1990)
<i>P. ostreatus</i> Florida	73	25	4,0	6,5	n. d.	n. d.	(Sannia <i>et al.</i> , 1991)
<i>P. eryngii</i>	73	17	3,9	5,0	55	384, 460	(Guillén <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. chrysosporium</i>	78	n. d.	5,35	6,0-7,0	45	368, 466	(Asada <i>et al.</i> , 1995)
<i>P. pulmonarius</i>	71	14	3,95	6,0	n. d.	n. d.	(Varela <i>et al.</i> , 2000a)
<i>T. cucumeris</i> Dec 1	65	n. d.	n. d.	5,5-7,5	45	n. d.	(Kim <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. ostreatus</i> K16-2	72	n. d.	I: 3,5 < II < III	I, II: 5,0 III: 6,0	50	370, 450	(Okamoto y Yanase, 2002)
(C) Deuteromicetos							
<i>B. adusta</i> (anamorfo)	76	7,4	4,45	6,0	45	392, 463	(Romero <i>et al.</i> , 2009)

¹Masa molecular determinada mediante SDS-PAGE.
²Contenido en carbohidratos de la proteína.
³La enzima de *F. solani* M-13-1 está parcialmente purificada y la de *T. versicolor* no está purificada, a diferencia del resto de AAO.
N. d., no determinado. I, II y III, se refiere a las diferentes isoformas.

La **Tabla 4.1** incluye las principales características fisicoquímicas de diversas AAO fúngicas. La mayoría son extracelulares, a excepción de la AAO de *P. chrysosporium*, de *B. cinerea* y de *A. terreus*. La AAO del anamorfo de *B. adusta* es similar a las AAO descritas en basidiomicetos. Éstas se caracterizan por ser glicoproteínas monoméricas, de 65-80 kDa, con pI de 3,5-5,5 y con valores óptimos de pH y temperatura próximos a 6,0 y 50 °C, respectivamente. En *P. ostreatus* K16-2 se purificaron tres isoenzimas (Okamoto y Yanase, 2002), en *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer y *Pleurotus floridanus* Singer se detectaron dos (Bourbonnais y Paice, 1988; Martínez *et al.*, 1994) y en *P. eryngii*, *P. ostreatus* Florida, *P. pulmonarius* y *Pleurotus cornucopiae* (Paulet) Rolland sólo una (Guillén *et al.*, 1992; Sannia *et al.*, 1991; Varela *et al.*, 2000a; Martínez *et al.*, 1994). Muheim *et al.* (1990) separaron mediante isoelectroenfoco dos isoformas de la AAO de *B. adusta* CBS 595.78 pero sugieren que podrían ser el resultado de diferentes modificaciones post-traduccionales. Este parece ser el caso de la AAO del anamorfo de *B. adusta* puesto que, tras su purificación, se suelen detectar diferentes formas de glicosilación que se diferencian ligeramente en su pI (según los resultados obtenidos desglucosilando con Endo H). Recientemente, se ha caracterizado una oxidasa de *A. terreus* MTCC 6324 que se ha incluido en el grupo de las AAO. Sin embargo, esta enzima es una lipoproteína, compuesta de 5 subunidades diferentes, con unas características y una especificidad de sustrato excepcionales (Kumar y Goswami, 2008).

4.3.2. Caracterización espectroscópica: efecto de los residuos adyacentes al FAD

La AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta el espectro de absorción característico de las flavoenzimas en su estado oxidado. En la **Tabla 4.1** se indican los máximos de absorción detectados, en este caso, en comparación con los de otras AAO. El coeficiente de extinción de las flavoenzimas oscila, generalmente, entre 10500 y 15400 M⁻¹·cm⁻¹ (Ghisla *et al.*, 1974). El valor calculado para la AAO del anamorfo de *B. adusta* se sitúa en este rango y es similar al obtenido para la AAO de *P. eryngii* (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006) (ϵ_{463} de 10932 y 11050 M⁻¹·cm⁻¹, respectivamente).

El FAD se une de forma covalente en la mayoría de las flavoproteínas con actividad oxidasa, mientras que este cofactor se une, generalmente, de forma no covalente en las deshidrogenasas o reductasas (Heuts *et al.*, 2009). Sin embargo, los estudios espectroscópicos, realizados con la AAO del anamorfo de *B. adusta*, revelaron que en esta oxidasa el FAD no está unido de forma covalente y este cofactor también es disociable en las demás AAO descritas hasta el momento (Ferreira *et al.*, 2005; Sannia *et al.*, 1991; Muheim *et al.*, 1990; Asada *et al.*,

1995; Kumar y Goswami, 2008). Es un hecho ampliamente documentado que las flavoenzimas con el cofactor unido de forma covalente tienen potenciales redox más elevados y que ésto afecta positivamente a su eficiencia catalítica (Heuts *et al.*, 2009). Esto se ha comprobado en la vainillil-alcohol oxidasa de *P. simplicissimum* reemplazando por una Ala la H422, que está involucrada en la unión covalente del FAD. Este mutante presenta el cofactor unido de forma no covalente y conserva la estructura de la proteína nativa, pero tiene un potencial redox y una velocidad de reducción del cofactor inferior (Fraaije *et al.*, 1999). Sin embargo, además del potencial redox, la eficiencia catalítica de las enzimas está condicionada por otros factores. Así, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presentó una eficiencia catalítica mayor para oxidar el alcohol vainillílico que la vainillil-alcohol oxidasa (31 y 19 s⁻¹·mM⁻¹, respectivamente), a pesar de que la constante de Michaelis de la AAO es 5 veces superior. Otro caso similar, es el de las colesterol oxidasas de tipo I y II, que catalizan la misma reacción pero pertenecen a familias diferentes. La de tipo I presenta un FAD disociable, mientras que la de tipo II establece un enlace covalente con el FAD. Estas proteínas presentan valores de velocidad de reducción del FAD similares utilizando colesterol como sustrato, a pesar de sus diferentes valores de potencial redox (-217 y -101 mV, respectivamente) (Pollegioni *et al.*, 1999).

A diferencia de las deshidrogenasas, la mayoría de oxidasas dependientes de flavina, estabilizan la semiquinona aniónica del cofactor y forman un aducto covalente entre el N⁵ de la isoaloxazina y el sulfito (Massey *et al.*, 1969). Sin embargo, la AAO del anamorfo de *B. adusta* no estabiliza la semiquinona aniónica, ni tampoco la neutra que es característica de deshidrogenasas (Massey *et al.*, 1969). Los espectros de absorción característicos de estos radicales del FAD no se detectaron durante la reducción anaerobia de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, utilizando diferentes alcoholes bencílicos o con ditionito sódico. En cuanto a su capacidad para reaccionar con sulfito, los estudios espectroscópicos, realizados con esta AAO, revelaron que sólo forma un aducto con este anión si se adicionan concentraciones extremadamente elevadas a la mezcla de reacción (0,7-1,7 M de sulfito y 22 µM de AAO). Sin embargo, las oxidasas generalmente presentan elevada afinidad por este compuesto e incluso, en algunos casos, se forma el aducto con concentraciones estequiométricas de sulfito y de enzima (Massey *et al.*, 1969). Los resultados obtenidos para la AAO de *P. eryngii* (Ferreira *et al.*, 2005) concuerdan con los obtenidos en la AAO del anamorfo de *B. adusta*.

Han sido descritas otras flavoenzimas con propiedades espectroscópicas excepcionales, como la glucosa oxidasa, la putrescina oxidasa, la vainillil-alcohol oxidasa, la eugenol oxidasa, la L-lactato deshidrogenasa (flavocitocromo

b₂) y la L-galactono-lactona deshidrogenasa. Como la mayoría de las oxidasas, la glucosa oxidasa presenta elevada afinidad por sulfito (Swoboda y Massey, 2001). Sin embargo, con esta flavoenzima es posible visualizar ambas formas de la semiquinona (aniónica y neutra) dependiendo del pH, con un pK_a de 7,3 (Massey y Palmer, 1966; Stankovich *et al.*, 1978). La putrescina oxidasa y la vainillil-alcohol oxidasa estabilizan la semiquinona aniónica, pero son inertes con el sulfito (DeSa, 1972; de Jong *et al.*, 1992b). En el caso de la vainillil-alcohol oxidasa, el mutante D170S reacciona con sulfito, a diferencia del mutante D170E. Esto indica que el residuo ácido D170, situado próximo al N⁵ de la flavina, evita la reacción de la enzima con el sulfito mediante repulsión electrostática (van den Heuvel *et al.*, 2000). En esta enzima también se ha localizado un residuo con carga positiva, cerca del N¹-C² = O, que estabiliza la semiquinona aniónica (R504) (van den Heuvel *et al.*, 2000). Ambos residuos (D170 y R504) están conservados en la eugenol oxidasa, que pertenece a la misma familia y que tampoco reacciona con sulfito (D151 y R472) (Jin *et al.*, 2007). A diferencia de la mayoría de las deshidrogenasas, la L-galactono-lactona deshidrogenasa y el flavocitocromo b₂, estabilizan la forma aniónica de la semiquinona y forman un aducto con sulfito. En la primera enzima, estudios de mutagénesis dirigida han revelado que la carga positiva de la R388 está implicada en ambos fenómenos (Leferink *et al.*, 2009). En el flavocitocromo b₂, la mutación del residuo Y254 implica una disminución de la afinidad por el sulfito (Gondry *et al.*, 2001). La conclusión que se infiere de estos estudios es que la capacidad para estabilizar los diferentes radicales del FAD (semiquinona aniónica o neutra) y de formar un aducto con el sulfito, está relacionada con los residuos situados en el centro activo.

Las estructuras cristalográficas de numerosas flavoenzimas han confirmado la presencia de un residuo con carga positiva o de un dipolo de una hélice α , que podría estabilizar una carga negativa localizada en las proximidades del N¹-C² = O de la flavina (Lario *et al.*, 2003; Hecht *et al.*, 1993; Wohlfahrt *et al.*, 1999; Vrieling *et al.*, 1991; Yue *et al.*, 1999; Bannwarth *et al.*, 2004; Hallberg *et al.*, 2002; Xia y Mathews, 1990; Lindqvist y Branden, 1989; Mattevi *et al.*, 1996; Trickey *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 1986; Rowland *et al.*, 1998; Hallberg *et al.*, 2004). La colina oxidasa de *A. globiformis* incluye la H466, que está localizada a ~ 3,3 Å del N¹ del anillo de isoaloxazina (Quaye *et al.*, 2008). Diversos estudios han revelado que el mecanismo catalítico de la colina oxidasa implica la activación del sustrato mediante la abstracción de un protón del hidroxilo y la estabilización del alcóxido resultante y, posteriormente, se produce la transferencia de un anión hidruro desde el carbono- α del sustrato hasta el N⁵ de la flavina (Gadda, 2008). El reemplazamiento de la H466 por una Ala, supone un

descenso de la velocidad de reducción de la enzima, que es parcialmente compensado agregando imidazolio a la mezcla de reacción pero no con su forma desprotonada (imidazol). Además, este mutante no estabiliza el alcóxido, el sulfito, ni la semiquinona aniónica, a diferencia de la enzima nativa. Estos resultados indican inequívocamente que la H466 está protonada durante la reducción de la enzima (Ghanem y Gadda, 2005).

La H466 de la colina oxidasa está conservada en todos los miembros de la familia GMC de oxidorreductasas (Kiess *et al.*, 1998; Dreveny *et al.*, 2001). Este residuo corresponde a la H513 y a la H502 en la AAO del anamorfo de *B. adusta* y de *P. eryngii*, respectivamente. Según el modelo molecular del anamorfo de *B. adusta*, la H513 está situada a $\sim 3,5$ Å del N¹ de la flavina. Recientemente, Ferreira *et al.* (2009) han realizado estudios de efecto isotópico con la AAO de *P. eryngii* para determinar su mecanismo catalítico. Los resultados obtenidos indican que el mecanismo es similar al de la colina oxidasa, pero se produce simultáneamente la abstracción del protón del hidroxilo y la transferencia del anión hidruro desde el carbono- α , sin la estabilización de un intermediario de tipo alcóxido. Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos con los mutantes de la colina oxidasa, parece probable que la H513 de la AAO del anamorfo de *B. adusta* y la H502 de la AAO de *P. eryngii*, no se encuentran protonadas durante la reducción de la enzima y por tanto no estabilizan el alcóxido, el ión sulfito, ni la semiquinona aniónica. A diferencia de la AAO de *P. eryngii*, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta un residuo ácido situado a $\sim 6,1$ Å del N⁵ (E106). Este residuo podría ejercer repulsión electrostática sobre el anión sulfito, como se ha demostrado en el caso del D170 de la vainillil-alcohol oxidasa aunque el D170 se sitúa más próximo al N⁵ (van den Heuvel *et al.*, 2000).

4.3.3. Actividad catalítica

Desde que en 1992, se purificaron la AAO de *P. eryngii* (Guillén *et al.*, 1992) y la vainillil-alcohol oxidasa de *P. simplicissimum* (de Jong *et al.*, 1992b), numerosos estudios han puesto de manifiesto las diferencias existentes entre estas dos oxidasas de alcoholes aromáticos (Ferreira *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2009; Fraaije *et al.*, 1995; Mattevi *et al.*, 1997). En cuanto a sus propiedades catalíticas, cabe destacar que: **i)** la vainillil-alcohol oxidasa sólo actúa sobre compuestos con un grupo hidroxilo en posición *para* del anillo bencénico mientras que este sustituyente reduce drásticamente la afinidad de la AAO; **ii)** la vainillil-alcohol oxidasa cataliza reacciones de desmetilación, hidroxilación y desaminación, que no son catalizadas por la AAO; y **iii)** El pH óptimo de la

vainillil-alcohol oxidasa es próximo a 10,0 y el de la AAO es aproximadamente 5,0.

La oxidasa del anamorfo de *B. adusta* presenta una especificidad de sustrato y un pH óptimo similar al de la AAO de *P. eryngii* (Guillén *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 2005). Además, con varios sustratos, los valores de la constante catalítica de ambas AAO son similares, lo que sugiere que podrían tener el mismo mecanismo catalítico. Sin embargo, su afinidad por algunos alcoholes difiere considerablemente. Así, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta más afinidad por los alcoholes bencílicos halogenados y *para*-hidroxilados que la AAO de *P. eryngii*, mientras que esta última destaca por su elevada afinidad por los alcoholes que incluyen un grupo metoxilo en posición *para* del anillo bencénico.

En los siguientes apartados se analizará la especificidad de sustrato del anamorfo de *B. adusta*, en comparación con las oxidasas mencionadas y con otras flavoenzimas relacionadas. Como se muestra a continuación, los análisis de QSAR, realizados con diferentes derivados monosustituídos del alcohol bencílico, han permitido determinar la contribución de las propiedades electrónicas (σ), estéricas (E_s y MR) e hidrofóbicas (π) de los sustituyentes, en los valores de las constantes cinéticas obtenidas.

4.3.3.1. Oxidación de alcoholes no fenólicos

Como en el caso de la AAO de *P. eryngii* (Ferreira *et al.*, 2005; Guillén *et al.*, 1992), la AAO del anamorfo de *B. adusta* cataliza la oxidación de alcoholes aromáticos no fenólicos, bencílicos y cinamílicos, y de alcoholes alifáticos poliinsaturados. Con ambas AAO, los valores más elevados de constante catalítica se obtuvieron utilizando el *p*-anisílico como sustrato ($\sim 100 \text{ s}^{-1}$), aunque la afinidad de la AAO del anamorfo de *B. adusta* por este alcohol *para*-metoxilado fue considerablemente inferior. El grupo metoxilo presenta un valor bajo de σ_p^+ y de π y elevado de MR. Como se describe a continuación, los valores de estos parámetros fisicoquímicos son consistentes con las constantes cinéticas obtenidas.

En el caso de los alcoholes *para*-sustituídos, la representación gráfica de Hammett de los valores de k_{cat} frente a los del parámetro electrónico σ_p^+ es lineal, con un valor de ρ de -0,7. El signo y la magnitud de la pendiente concuerdan con la formación de una carga positiva débil en la etapa limitante de la reacción. La oxidación está facilitada por los sustituyentes dadores de electrones en posición *para*, porque estos grupos estabilizan esta carga mediante resonancia. Estos resultados son compatibles con un mecanismo catalítico que implique la abstracción del protón del hidroxilo y la transferencia simultánea del anión

hidruro del C- α . En el caso de la AAO de *P. eryngii*, los análisis de QSAR han revelado resultados similares (Ferreira *et al.*; resultados no publicados) y los estudios de efecto isotópico, como se mencionó en el apartado anterior, han confirmado que la ruptura de ambos enlaces del sustrato es sincrónica (Ferreira *et al.*, 2009). Valores similares de ρ han sido descritos en la alcohol deshidrogenasa ($\rho = -0,8$), la L-lactato oxidasa ($\rho = -0,6$) y la D-amino ácido oxidasa ($\rho = -0,7$) (Hardman *et al.*, 1974; Yorita *et al.*, 1997; Pollegioni *et al.*, 1997). Por el contrario, en la metanol oxidasa de *C. boidinii* la ruptura de los enlaces se realiza en etapas separadas y los valores de k_{cat}/K_m correlacionan con los de σ_p^- , con un valor de pendiente positivo ($\rho = 1,9$). Este resultado es consistente con la estabilización del intermediario alcóxido, en la etapa limitante de la reacción, mediante los sustituyentes capaces de atraer electrones (Menon *et al.*, 1995).

Los valores del parámetro MR también influyen en la k_{cat} de la AAO del anamorfo de *B. adusta*. MR es considerado generalmente un parámetro estérico, puesto que se define como el volumen molar (masa molar/densidad) corregido por el índice de refracción (según la ecuación de Lorentz–Lorenz). Sin embargo, MR es directamente proporcional a la polarizabilidad electrónica y varios autores han cuestionado su papel como factor estérico (Charton y Charton, 1979). Cuanto mayor es la polarizabilidad, mayor es la fuerza de dispersión y, por tanto, el sustrato interacciona más estrechamente con la enzima. Con los alcoholes *meta*- y *para*-sustituídos, valores elevados de MR incrementan la velocidad de la reacción catalizada por la AAO del anamorfo de *B. adusta* (aunque la magnitud de la pendiente es reducida). Sin embargo, los valores del parámetro estrictamente estérico E_s no correlacionan con los de k_{cat} utilizando los alcoholes *para*-bencílicos, mientras que utilizando los alcoholes *meta*-bencílicos se calculó una pendiente negativa y un valor de R bajo ($R = 0,7$). Por tanto, en ambos casos es probable que el efecto del parámetro MR esté relacionado con fuerzas de dispersión, en vez de con efectos estéricos. Un resultado similar se ha obtenido en la AAO de *P. eryngii* (Ferreira *et al.*; resultados no publicados) y en la galactosa oxidasa del ascomiceto *Hypomyces rosellus* (Alb. & Schwein.) Tul. & C. Tul. (Whittaker y Whittaker, 2001).

En cuanto a la afinidad de la AAO del anamorfo de *B. adusta* por los alcoholes bencílicos, los valores de la constante de Michaelis-Menten disminuyen cuanto mayor es el valor de π de los sustituyentes en posición *meta* y *para*. Así, la enzima presenta una elevada afinidad por los compuestos clorados y metilados, en comparación con los metoxilados (π del Cl, CH₃ y OCH₃ de 0,71, 0,56 y -0,02, respectivamente). Además, este resultado explica las diferencias obtenidas entre el efecto del F (π de 0,14) y del Cl, a pesar de que

ambos son halógenos. Esta correlación indica que las interacciones hidrofóbicas favorecen la unión de los sustratos y, por tanto, que la enzima presenta un bolsillo de unión apolar en el centro activo. Resultados similares han sido descritos previamente en la monoamino oxidasa B humana utilizando análisis de QSAR con diferentes bencilaminas sustituidas en posición *para* ($a = -1,02 \pm 0,12$) (Walker y Edmondson, 1994) y estudios estructurales (Binda *et al.*, 2003). Se dispone de muchos otros ejemplos, como la amino oxidasa de suero bovino (Hartmann y Klinman, 1991) y la alcohol deshidrogenasa de levadura (Klinman, 1976). En el caso de los alcoholes bencílicos *meta*-sustituidos, la afinidad de la AAO del anamorfo de *B. adusta* podría estar también influenciada por los valores del parámetro E_s de los sustituyentes. Este resultado indica que los grupos voluminosos en posición *meta* disminuyen la afinidad.

Recientemente, la estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii* ha confirmado la naturaleza hidrofóbica de su centro activo (Fernández *et al.*, 2009). Con esta enzima, los valores de K_m correlacionan con los de π utilizando alcoholes bencílicos *meta*- y *para*-sustituidos como sustratos. Sin embargo, el efecto del parámetro estérico E_s es considerablemente más relevante en el caso de los *meta*-sustituidos, según los valores de las pendientes de la ecuación obtenida con los dos parámetros mencionados (Ferreira *et al.*; resultados no publicados). Así, esta enzima presenta valores de K_m similares con el alcohol *m*-fluorobencílico y el *m*-metoxibencílico, que son superiores a los del *m*-clorobencílico e inferiores a los del bencílico (E_s del Cl, OCH₃, F, e H de -0,97, -0,55, -0,46 y 0,00, respectivamente). La elevada afinidad de la AAO de *P. eryngii* por el alcohol *p*-anisílico no es acorde al valor de π del grupo metoxilo. Por tanto, el coeficiente de correlación incrementa significativamente si no se incluye en el análisis este sustrato. El efecto positivo del grupo *para*-metoxilo en la afinidad de esta enzima, también se observa con los alcoholes disustituidos, veratrílico y 3-cloro-*p*-anisílico. Sin embargo, este sustituyente no ejerce el mismo efecto en el caso de la AAO del anamorfo de *B. adusta*. La afinidad de esta última por el *p*-anisílico y el veratrílico es aproximadamente 6 y 4 veces inferior que la de la enzima de *P. eryngii*. Además, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta el doble de afinidad por el *m*-clorobencílico que por el 3-cloro-*p*-anisílico. La F501 de la AAO de *P. eryngii*, corresponde al W512 de la AAO del anamorfo. El mutante F501W, de la AAO de *P. eryngii*, presenta con el *p*-anisílico un valor de K_m considerablemente superior que el de la enzima nativa (~ 15 veces) (Ferreira *et al.*; resultados no publicados). Sin embargo, la afinidad de este mutante también es más baja que la de la AAO del anamorfo, utilizando este alcohol *para*-metoxilado como sustrato (~ 2 veces).

La producción de metabolitos secundarios aromáticos (alcoholes, aldehídos y ácidos) ha sido descrita en varias especies de basidiomicetos, en condiciones de laboratorio y en la Naturaleza (de Jong *et al.*, 1994c; Gallois *et al.*, 1990; Goetghebeur *et al.*, 1992). En el caso de *Bjerkandera* spp., dependiendo de la cepa y de la composición del medio de cultivo, el compuesto sintetizado en concentraciones más elevadas es alcohol veratrílico, veratraldehído o 3-cloro-*p*-anisaldehído (de Jong *et al.*, 1992a; Mester *et al.*, 1998; Spinnler *et al.*, 1994). Además de este último, muchos otros organoclorados son producidos por las especies de este género (p. ej., 3,5-dicloro-*p*-anisaldehído, 3-cloro-*p*-hidroxibenzoico, metil 3,5-dicloro-4-hidroxibenzoico) (Verhagen *et al.*, 1998). Sin embargo, en el caso del género *Pleurotus* sólo algunas especies producen concentraciones bajas de 3-cloro-*p*-anisaldehído, siendo el *p*-anisaldehído el metabolito producido mayoritariamente (Gutiérrez *et al.*, 1994; Okamoto *et al.*, 2002). Entre otras funciones, estos compuestos tienen un papel clave en la degradación de la lignina (de Jong *et al.*, 1994b). El veratrílico previene la inactivación de la LiP por H₂O₂ (Tonon y Odier, 1988) y además el radical catiónico de este alcohol actúa como mediador redox de la LiP (Harvey *et al.*, 1986; Tien y Ma, 1997; Paszczynski y Crawford, 1991). Esto explica que en cultivos de *Bjerkandera* sp. BOS55 se hayan detectado simultáneamente elevadas concentraciones de alcohol veratrílico y de LiP, incluso en ausencia de AAO (Mester *et al.*, 1998). Además, la baja afinidad por el veratrílico de las AAO de todas las cepas de *Bjerkandera* spp. descritas hasta el momento (incluyendo la del anamorfo objeto de estudio), indica que este compuesto no es el sustrato fisiológico para estas flavoenzimas (Muheim *et al.*, 1990; de Jong *et al.*, 1994a; Romero *et al.*, 2009). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en el caso del anamorfo de *B. adusta*, estas oxidasas presentan una elevada afinidad por el alcohol 3-cloro-*p*-anisílico y otros alcoholes mono- y di-clorados que producen en elevadas concentraciones. En *Bjerkandera* sp. BOS55 se ha confirmado que el H₂O₂ requerida por las peroxidasas ligninolíticas es obtenida mediante ciclos de oxidorreducción de estos metabolitos clorados, con la participación de las AAO y también de aril-alcohol deshidrogenasas miceliales (de Jong *et al.*, 1994a; Hage *et al.*, 1999). En el caso de *Pleurotus* spp., este ciclo está favorecido por la síntesis *de novo* de *p*-anisaldehído y la elevada afinidad por el alcohol *p*-anisílico que presentan las AAO producidas por las especies de este género (Guillén *et al.*, 1994; Guillén y Evans, 1994). Es interesante, desde un punto de vista ecológico, que las especies de *Bjerkandera* y de *Pleurotus* secretan cantidades elevadas de los alcoholes bencílicos que son mejores sustratos de sus correspondientes AAO.

La oxidación de alcoholes bencílicos, aunque muy ineficiente, ha sido descrita también en algunas metanol oxidasas (Menon *et al.*, 1995; Bringer *et al.*, 1979; Ko *et al.*, 2005; Daniel *et al.*, 2007), aunque los alcoholes alifáticos primarios (C₁-C₄) son los sustratos preferidos por estas flavoenzimas. Se han descrito metanol oxidasas en varias especies de ascomicetos (Ko *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 1976; Kondo *et al.*, 2008; Menon *et al.*, 1995) y en algunos basidiomicetos descomponedores de la madera (Nishida y Eriksson, 1987; Bringer *et al.*, 1979; Daniel *et al.*, 2007). En estos últimos, el metanol liberado, debido a la desmetoxilación de la lignina (Niemenmaa *et al.*, 2008; Yelle *et al.*, 2008), es sustrato de sus metanol oxidasas y, por consiguiente, contribuye a producir H₂O₂. El metanol no es oxidado por la AAO del anamorfo de *B. adusta* y tampoco por la AAO de *P. eryngii* (Guillén *et al.*, 1992). Además, la masa molecular de las metanol oxidasas (250-700 kDa), así como otras propiedades fisicoquímicas, diferencian claramente a estas enzimas de las AAO (aunque pertenecen a la misma familia). Sin embargo, los estudios de inhibición, realizados con la AAO del anamorfo de *B. adusta*, revelaron que el metanol es inhibidor competitivo de la oxidación de alcohol veratrílico. Este es el primer estudio que muestra que un alcohol alifático saturado puede inhibir la actividad oxidasa sobre alcoholes aromáticos, aunque sólo a concentraciones extremadamente elevadas (rango M). En el caso de *P. eryngii*, no se observó este efecto inhibitorio, probablemente porque se utilizaron concentraciones inferiores de metanol en estudios similares (Guillén *et al.*, 1992). En cuanto a la vainillil-alcohol oxidasa, no presenta actividad sobre alcoholes alifáticos, saturados o insaturados, y tampoco éstos son inhibidores (de Jong *et al.*, 1992b).

4.3.3.2. Oxidación de alcoholes fenólicos

Se estudió la influencia del grupo hidroxilo fenólico en la actividad AAO del anamorfo de *B. adusta*. Los valores de k_{cat} obtenidos con el alcohol vainillílico son similares a los del *m*-anisílico (44 y 54 s⁻¹, respectivamente) y superiores a los del bencílico (6 s⁻¹) y otros sustratos no fenólicos de esta enzima. Esto también se observa en el caso de la AAO de *P. eryngii* (Ferreira *et al.*; resultados no publicados) aunque esta oxidasa presenta valores de k_{cat} con el vainillílico (16 s⁻¹) inferiores a los obtenidos con la AAO del anamorfo de *B. adusta*. Esto se debe a que el grupo metoxilo, en posición *meta*, no tiene el mismo efecto en las dos AAO, puesto que se observa la misma diferencia en sus valores de k_{cat} con un sustrato no fenólico con este sustituyente, el *m*-anisílico ($k_{\text{cat}} \sim 3$ veces inferior en *P. eryngii*). La Y92 de la AAO de *P. eryngii*, situada sobre el anillo de flavina, está reemplazada por la F104 en la AAO del anamorfo. El mutante Y92F, de la AAO de *P. eryngii*, presenta más actividad sobre el *m*-anisílico que

la enzima nativa (~ 2 veces) (Ferreira *et al.*, 2006). Por tanto, el residuo F104 del anamorfo podría favorecer la actividad sobre los compuestos con un grupo *meta*-metoxilo. En cuanto al alcohol isovainillílico, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta valores de k_{cat} (56 s^{-1}) similares a los del vainillílico. Sin embargo, la enzima de *P. eryngii* tiene considerablemente más actividad sobre el alcohol *para*-metoxilado (~ 7 veces). Los valores de k_{cat} de *P. eryngii* con el isovainillílico son similares a los obtenidos con el veratrílico (Ferreira *et al.*; resultados no publicados) y superiores a los de la enzima del anamorfo con los mismos alcoholes (~ 2 veces). Esto sugiere que, con los alcoholes disustituídos (como con los monosustituídos), independientemente de su naturaleza fenólica o no fenólica, el grupo *para*-metoxilo tiene un efecto positivo en los valores de k_{cat} de la AAO de *P. eryngii*, que no se observa en la oxidasa del anamorfo. Finalmente cabe destacar, que los valores de k_{cat} de ambas AAO con el alcohol vainillílico son superiores a los descritos en la vainillil-alcohol oxidasa de *P. simplicissimum* y la eugenol oxidasa de *Rhodococcus* sp. Zopf (5 y 12 s^{-1} , respectivamente) (Fraaije *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 2007).

Como se indicó en el apartado anterior, los valores de σ_p^+ y de MR correlacionan con los de k_{cat} para ambas AAO. Esto es consistente con las diferencias obtenidas entre el *p*-hidroxibencílico y el *p*-anisílico (k_{cat} de 48 y 121 s^{-1} para la AAO del anamorfo, respectivamente). Los grupos hidroxilo y metoxilo tienen valores bajos y similares de σ_p^+ ($-0,92$ y $-0,78$, respectivamente) y, por tanto, ambos facilitan la etapa limitante de la reacción. Sin embargo, los grupos hidroxilo presentan valores de MR considerablemente inferiores, que afectan negativamente a los valores de k_{cat} (MR de 2,85 y 7,87). Con el *p*-hidroxibencílico, el valor de k_{cat} de la AAO de *P. eryngii* (51 s^{-1}) es similar al de la oxidasa del anamorfo (Ferreira *et al.*; resultados no publicados) y ambos son superiores a los de la vainillil-alcohol oxidasa de *P. simplicissimum* (de Jong *et al.*, 1992b). El valor de k_{cat} de la AAO del anamorfo de *B. adusta* con el alcohol coniferílico fue inferior al obtenido con el cinamílico ($\sim 2,4$ veces). En el caso de la AAO de *P. eryngii*, también el cinamílico es mejor sustrato que el compuesto fenólico (Guillén *et al.*, 1992). Ninguno de los dos alcoholes son oxidados por la vainillil-alcohol oxidasa de *P. simplicissimum*, aunque son inhibidores competitivos de esta enzima (de Jong *et al.*, 1992b; Fraaije *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta los resultados expuestos hasta el momento en este apartado, se puede concluir que la presencia de un grupo hidroxilo en el anillo bencénico, en posición *para*, tiene el mismo efecto en los valores de k_{cat} para la AAO de *P. eryngii* y del anamorfo de *B. adusta*. Sin embargo, la afinidad de estas enzimas por los alcoholes bencílicos *para*-hidroxilados difiere considerablemente. Así, los valores de K_m de la AAO del anamorfo de *B. adusta*

son 3 y 26 veces inferiores que los de la AAO de *P. eryngii* con los alcoholes *p*-hidroxibencílico y vainillílico, respectivamente. Además, a diferencia de la enzima de *P. eryngii*, la afinidad de la AAO del anamorfo por los tres alcoholes disustituídos fenólicos utilizados (vainillílico, isovainillílico y coniferílico) es superior que por el alcohol disustituído no fenólico veratrílico. En la AAO intracelular caracterizada en *P. chrysosporium* (Asada *et al.*, 1995), cuyo mejor sustrato es el *m*-anisílico y el peor el *p*-anisílico, se obtuvo un valor de K_m con el vainillílico considerablemente inferior al de la AAO del anamorfo (~ 56 veces). También se ha descrito una AAO en *T. cucumeris* Dec 1 con actividad muy baja sobre el bencílico y el *p*-hidroxibencílico y una afinidad por el vainillílico similar a la del anamorfo de *B. adusta* (1,2 mM) (Kim *et al.*, 2001). Previamente, Muheim *et al.* (1990) detectaron que la AAO de un teleomorfo de *B. adusta* tiene actividad sobre vainillílico y *p*-hidroxibencílico, pero no se ha estudiado en detalle. En comparación con la vainillil-alcohol oxidasa de *B. fulva* V107 (Furukawa *et al.*, 1999), la AAO del anamorfo tiene un valor de K_m aproximadamente 7 veces superior con el vainillílico, pero sólo 2 veces más elevado con el *p*-hidroxibencílico. Por tanto, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta una afinidad intermedia por los alcoholes bencílicos *para*-hidroxilados y es la primera enzima caracterizada que oxida eficientemente una amplia gama de alcoholes bencílicos fenólicos y no fenólicos. Esto incrementa su potencial como catalizador en diferentes procesos biotecnológicos, como la producción de aromas de elevado valor comercial (p. ej., vainillina o benzaldehído). En relación con esto último, cabe mencionar que recientemente se han introducido 4 genes en *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen que codifican para enzimas que participan en una ruta de biosíntesis de vainillina a partir de glucosa (Hansen *et al.*, 2009). El rendimiento de este sistema (45 mg/L) está limitado porque parte de la vainillina formada es reducida a alcohol vainillílico por la levadura. Los niveles de producción podrían incrementarse si se incluye en la levadura el gen que codifica la AAO del anamorfo de *B. adusta*, puesto que esta enzima oxidaría el alcohol formado a vainillina.

4.3.3.3. Reacciones de desmetilación, hidroxilación y desaminación

Como se indicó anteriormente, la vainillil-alcohol oxidasa de *P. simplicissimum* cataliza reacciones de desmetilación, hidroxilación y desaminación de compuestos *para*-hidroxilados (Fraaije *et al.*, 1995), además de oxidar los alcoholes bencílicos fenólicos mencionados en el apartado anterior. De hecho, se ha descrito que el sustrato fisiológico de esta enzima es el *p*-(metoximetil)fenol, cuya desmetilación implica la formación de *p*-hidroxibenzaldehído, metanol y H_2O_2 (Fraaije y van Berkel, 1997). Sin embargo, la vainillil-alcohol oxidasa de

B. fulva V107 no presenta actividad sobre este último sustrato y tampoco sobre *p*-hidroxibencilaminas (Furukawa *et al.*, 1999).

La AAO del anamorfo de *B. adusta*, como la enzima de *P. eryngii* (Ferreira *et al.*, 2005), no cataliza estas reacciones, independientemente de la naturaleza fenólica o no fenólica del compuesto y del pH utilizado. Sin embargo, todos los compuestos ensayados, resultaron ser inhibidores de la oxidación de alcohol veratrílico (bencilmetil éter, *p*-(metoximetil)fenol, eugenol y *p*-metoxibencilamina) (Romero *et al.*, 2009). Además, los dos mejores sustratos de la vainillil-alcohol oxidasa, eugenol y chavicol (Fraaije *et al.*, 1995), son los inhibidores con más afinidad por la AAO del anamorfo de *B. adusta* y de *P. eryngii* (Ferreira *et al.*, 2005), respectivamente. Estos resultados indican que en el centro activo de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, además de los alcoholes, se pueden unir diferentes compuestos aromáticos, como se ha descrito previamente en el caso de la AAO de *P. eryngii* (Ferreira *et al.*, 2005).

4.3.3.4. Oxidación de aldehídos aromáticos

Los estudios de especificidad de sustrato de Guillén *et al.* (1992), revelaron que la AAO de *P. eryngii* cataliza la oxidación de diferentes aldehídos aromáticos, liberando los correspondientes ácidos y H₂O₂. Posteriormente, Ferreira *et al.* (2005) confirmaron estos resultados mediante ¹⁹F NMR, utilizando *p*-fluorobenzaldehído como sustrato. En la AAO del anamorfo de *B. adusta*, también se han descrito estas reacciones y los ácidos liberados se han identificado mediante espectroscopía UV-Vis (Romero *et al.*, 2009). Estos estudios han puesto de manifiesto que la actividad de ambas AAO sobre los aldehídos es considerablemente inferior que sobre los alcoholes y que está facilitada por los sustituyentes desactivadores del anillo bencénico. Por el contrario, la vainillil-alcohol oxidasa no presenta actividad sobre los aldehídos (de Jong *et al.*, 1992b).

Teniendo en cuenta los valores de eficiencia catalítica de la AAO de *P. eryngii* (Ferreira *et al.*, 2010) y de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, el *m*-clorobenzaldehído es el mejor sustrato de ambas enzimas (0,6 y 1 s⁻¹·mM⁻¹, respectivamente). La afinidad de la AAO de *P. eryngii* es mayor por los aldehídos *para*-metoxilados (*p*-anisaldehído y 3-cloro-*p*-anisaldehído) aunque con estos compuestos se obtuvieron los valores más bajos de *k*_{cat}. Los valores de *k*_{cat} más elevados con esta enzima se obtuvieron con el *p*-nitrobenzaldehído y con diferentes aldehídos halogenados. De igual modo, en el caso de la AAO del anamorfo, los valores de *K*_m y de *k*_{cat} fueron más bajos con el 3-cloro-*p*-anisaldehído que con los aldehídos que incluyen sustituyentes desactivantes (*m*-clorobenzaldehído, *p*-nitrobenzaldehído y *m*-fluorobenzaldehído) (Romero *et al.*,

2009). Sin embargo, esta última AAO presenta más afinidad que la enzima de *P. eryngii* por los mismos aldehídos (~ 8-15 veces), pero valores inferiores de k_{cat} (~ 4-408 veces). Cabe destacar, que en el caso de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, los valores de K_m con el 3-cloro-*p*-anisaldehído y el *m*-fluorobenzaldehído son similares a los obtenidos utilizando los correspondientes alcoholes como sustratos.

La actividad de la AAO de *P. eryngii* y del anamorfo de *B. adusta* sobre los aldehídos podría deberse a que, en solución acuosa, los compuestos carbonílicos se encuentran en equilibrio con sus formas hidratadas (dioles geminales o *gem*-dioles). En el caso de los aldehídos aromáticos, la concentración de *gem*-diol es generalmente muy baja, pero depende de la naturaleza electrónica de los sustituyentes del anillo bencénico. Así, los sustituyentes que pueden atraer electrones del anillo aromático desestabilizan al grupo carbonilo y por tanto favorecen la adición nucleofílica de H_2O . Utilizando la forma hidratada del aldehído como sustrato, la colina oxidasa y otras enzimas, catalizan la transferencia del anión hidruro para formar el correspondiente ácido (Barbosa *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 1981; Corbier *et al.*, 1992). En algunos casos, la hidratación es dependiente de un metal coordinado con hidróxido (Olson *et al.*, 1996). Sin embargo, otras enzimas utilizan el aldehído no hidratado, formando un intermediario hemitioacetal mediante el ataque nucleofílico de una Cys, desde el que se transfiere un anión hidruro a NAD^+ o NADP^+ (Marchal y Branlant, 1999).

Recientemente, Ferreira *et al.* (2010) determinaron la velocidad de hidratación de diferentes aldehídos bencílicos mediante ^1H -NMR. Los valores obtenidos son directamente proporcionales a la actividad de la AAO de *P. eryngii* sobre los mismos aldehídos. Teniendo en cuenta estos resultados y que esta enzima carece de Cys y metales en su centro activo, se ha postulado que la AAO de *P. eryngii* cataliza la oxidación de los aldehídos tras su hidratación espontánea en solución acuosa. Según los estudios de mutagénesis dirigida (Ferreira *et al.*, 2010), las His conservadas en el centro activo de esta AAO (H502 e H546) son esenciales para la oxidación de los *gem*-dioles, como se describió previamente para la oxidación de los alcoholes (Ferreira *et al.*, 2006). La AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta también los valores de k_{cat} más elevados utilizando como sustratos los aldehídos con sustituyentes desactivadores del anillo bencénico (que son los de mayor facilidad para hidratarse). Por tanto, cabe esperar que ambas enzimas presenten el mismo mecanismo para la oxidación de aldehídos. Además, el centro activo de la AAO del anamorfo, como se observa en su modelo molecular, tampoco incluye ninguna Cys y presenta dos His (H513 e H557) que equivalen a las dos His

catalíticas de la AAO de *P. eryngii*. Sin embargo, la AAO del anamorfo, a diferencia de la enzima de *P. eryngii*, presenta un valor de k_{cat} más elevado oxidando el *m*-clorobenzaldehído que el *p*-nitrobenzaldehído (~ 50 veces), a pesar de que este último tiene una velocidad de hidratación superior.

Como se mencionó anteriormente, la Y92 de la AAO de *P. eryngii* equivale a la F104 de la AAO del anamorfo (residuos sobre el anillo de flavina). La mutación Y92F, de la AAO de *P. eryngii*, no afecta significativamente a la velocidad de oxidación del *p*-nitrobenzaldehído, pero aumenta la afinidad de la enzima por este sustrato ($\sim 2,5$ veces). Sin embargo, con el *p*-anisalaldehído, el mutante Y92F presenta valores de k_{cat} inferiores a la enzima nativa (~ 5 veces) aunque tiene una afinidad similar (Ferreira *et al.*, 2010). En el caso de este último aldehído, no se detectó formación de *gem*-diol mediante $^1\text{H-NMR}$, mientras que el *p*-nitrobenzaldehído presentó la velocidad de hidratación más elevada. Teniendo en cuenta estos resultados, Ferreira *et al.* (2010) propusieron que el grupo hidroxilo de la Y92 facilita la activación de los aldehídos no hidratados espontáneamente o que este residuo favorece la oxidación de la baja concentración de *gem*-diol formada (inferior al límite de detección del $^1\text{H-NMR}$). Utilizando el *p*-anisalaldehído como sustrato, la actividad de la AAO del anamorfo de *B. adusta* fue muy reducida (no se calcularon las constantes cinéticas) y, como se mencionó anteriormente, esta AAO presenta con todos los aldehídos utilizados valores de k_{cat} considerablemente inferiores que los de la enzima de *P. eryngii*. Teniendo en cuenta el efecto de la mutación Y92F en la AAO de *P. eryngii* y que la Y92 equivale a la F104 de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, parece interesante profundizar en el efecto de este residuo sobre los diferentes valores de las constantes cinéticas que tienen estas enzimas con los aldehídos.

Durante la incubación de algunos alcoholes con la AAO del anamorfo, se detectaron cantidades superiores de H_2O_2 que de aldehído. Este exceso de peróxido se debe a la oxidación de los aldehídos, producidos a partir de los alcoholes agregados a la mezcla de reacción. En el caso del *p*-fluorobencílico, se produjo prácticamente el doble de H_2O_2 que de aldehído. También se detectó un exceso significativo de H_2O_2 con el cinamílico y el *p*-clorobencílico, mientras que con los demás alcoholes se produjeron concentraciones estequiométricas de aldehído y peróxido o las diferencias fueron menos significativas. En el caso de la AAO de *P. eryngii*, también se ha detectado el doble de H_2O_2 que de aldehído utilizando el 3-cloro-*p*-anisílico como sustrato (Ferreira *et al.*, 2010). Se han descrito otras enzimas que catalizan la oxidación directa de alcoholes a ácidos, sin la liberación del aldehído que se forma como intermediario. En la colina oxidasa, a concentraciones saturantes de colina, se libera del centro activo menos del 10% de la betaína-aldehído formada (Gadda, 2003). En el caso de la tiamina

oxidasa, el aldehído sólo se libera a concentraciones saturantes de tiamina (Gómez-Moreno y Edmondson, 1985). Un mecanismo similar también se ha descrito en enzimas dependientes de NAD, como la histidinol deshidrogenasa (Grubmeyer *et al.*, 1987; Barbosa *et al.*, 2002). A diferencia de todas estas enzimas productoras de ácidos carboxílicos, la función fisiológica de la AAO es probablemente la producción extracelular de H_2O_2 , que es el sustrato oxidante de las peroxidasas ligninolíticas y participa en la reacción de Fenton para generar $OH\cdot$.

Desde un punto de vista ecológico, resulta interesante que las AAO posean actividad sobre una amplia gama de alcoholes y aldehídos. Esto aumenta su eficacia para la producción de H_2O_2 extracelular, que es esencial para la degradación de los materiales lignocelulósicos en los ecosistemas terrestres. Prueba de ello, es que las AAO y otras oxidasas productoras de peróxido, son generadas tanto por los hongos de podredumbre blanca (Vanden Wymelenberg *et al.*, 2009) como por los de parda, a pesar de que estos últimos carecen de peroxidasas ligninolíticas (Martínez *et al.*, 2009).

4.3.4. Una nueva AAO en la familia GMC de oxidorreductasas

4.3.4.1. Análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica

Como se ha descrito anteriormente, la flavoenzima del anamorfo de *B. adusta* oxida eficientemente algunos sustratos de las vainillil-alcohol oxidasas, además de los típicos de las AAO. Sin embargo, su secuencia aminoacídica y sus propiedades fisicoquímicas, indican inequívocamente que es una AAO, similar a la de *P. eryngii* y de otros basidiomicetos implicados en la degradación de materiales lignocelulósicos en los ecosistemas terrestres.

Se secuenciaron 2430 pb del gen que codifica la AAO del anamorfo, utilizando diferentes técnicas de biología molecular basadas en la PCR. La secuencia obtenida incluye la región codificante de la proteína madura (1737 pb) interrumpida por 9 intrones y la 3'-UTR. Cuando los genes se expresan en niveles elevados, generalmente se observa una predisposición acusada hacia determinados codones (Bennetzen y Hall, 1982; Ballance, 1986). Esto concuerda con los resultados obtenidos para la AAO del anamorfo, puesto que es una proteína mayoritaria en el cultivo y utiliza preferentemente los codones terminados en C y en G, mientras que los terminados en A son muy poco frecuentes (43, 28 y 8%, respectivamente). Esto implica que la región codificante presente un elevado contenido en G+C, que es ligeramente superior al de los intrones y al de la región 3'-UTR (58,7, 46,2 y 41,4%, respectivamente). Como en otras enzimas fúngicas (Ballance, 1986), los intrones de la AAO del anamorfo

presentan una longitud reducida (47-60 nt) e incluyen secuencias consenso en el extremo 5', en el centro de ramificación y en el extremo 3' (GTRMGY, RCTRAY y YAG, respectivamente). La mayoría de los intrones, de la AAO del anamorfo, presentan al menos una región polipirimidínica anterior al centro de ramificación. Esto se ha descrito en varias especies fúngicas, mientras que en los intrones de mamíferos las regiones polipirimidínicas son adyacentes al extremo 3' (Kupfer *et al.*, 2004). El ARN_m maduro de la AAO del anamorfo presenta una 3'-UTR de 203 nt, contigua al codón de terminación TGA. Su longitud es acorde a la media de 241,6 nt descrita en hongos (Pesole *et al.*, 2000). Esta región contiene 3 señales de poliadenilación hipotéticas, con la misma secuencia que en las AAO de *Pleurotus* spp. (AATA) (Varela *et al.*, 1999; Varela *et al.*, 2000a), similares a la señal de poliadenilación conservada en eucariotas superiores (AATAAA) (Ballance, 1986).

El ORF de la AAO del anamorfo de *B. adusta* codifica para 579 aminoácidos, mientras que la AAO secretada por *P. eryngii* sólo contiene 566 porque su N-terminal es de menor longitud (Varela *et al.*, 1999). Ambas AAO son glicoproteínas pero el contenido en carbohidratos de la oxidasa del anamorfo de *B. adusta* es de 7,4% y el de la enzima de *P. eryngii* es de 15%. Se han identificado varios sitios de glicosilación hipotéticos en la AAO del anamorfo de *B. adusta* y de *P. eryngii* (8 y 6, respectivamente), pero únicamente dos de ellos coinciden en ambas oxidasas (N74 y N380 del anamorfo y N62 y N369 de *P. eryngii*). La AAO de *P. eryngii* y de *P. pulmonarius* comparten un 95% de identidad de secuencia, mientras que con la AAO del anamorfo de *B. adusta* sólo un 45%. Sin embargo, el contenido de residuos hidrófilos, hidrófobos, ácidos y básicos es similar en la AAO del anamorfo de *B. adusta* (25, 54, 11 y 10%, respectivamente) y en las dos especies de *Pleurotus* mencionadas (28, 54, 10 y 8%, respectivamente). Hasta el momento, únicamente han sido clonadas y secuenciadas estas tres AAO, aunque se han descrito varias hipotéticas en diferentes especies. Con algunas de estas últimas, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta una identidad de secuencia similar, o incluso superior, que con las AAO de *Pleurotus* spp.

Tras la secuenciación de la AAO de *P. eryngii*, esta enzima se incluyó en la familia GMC de oxidorreductasas, en base a varios motivos conservados y también a su estructura terciaria. Como las demás AAO, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta las 4 secuencias consenso características de esta familia: **i)** DBM; **ii)** *Signature 1*; **iii)** *Signature 2*; y **iv)** motivo adyacente al extremo C-terminal. Con respecto a estos motivos conservados, cabe destacar que en la *Signature 1*, la AAO del anamorfo presenta la N103, que está conservada en los miembros de esta familia, a excepción de la AAO de *P. eryngii* y de *P.*

pulmonarius que presentan la H91. Este residuo está implicado en la actividad de la AAO de *P. eryngii*, según los estudios de mutagénesis dirigida de Ferreira *et al.* (2004). En la *Signature 1* del anamorfo de *B. adusta* también se localiza la F104 y el E106. Las dos AAO del género *Pleurotus* y las metanol oxidasas tienen un residuo aromático en la misma posición que la F104 de la AAO del anamorfo, mientras que la presencia de un residuo ácido en la posición del E106 no se ha descrito en ninguna enzima de la familia GMC de oxidorreductasas. El posible papel de estos dos últimos residuos se analizará en el **Apartado 4.3.4.2.2**. En cuanto al motivo adyacente al extremo C-terminal, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta el residuo apolar L535, mientras que en esta posición son frecuentes los residuos básicos Arg o Lys (K524 en *P. eryngii*). Los demás motivos conservados de la AAO del anamorfo no incluyen ningún residuo inusual, en comparación con las demás enzimas de esta familia.

4.3.4.2. Análisis del modelo molecular

La familia GMC de oxidorreductasas incluye una amplia variedad de enzimas, de organismos procariotas y eucariotas, que contienen FAD como grupo prostético. Actualmente se dispone de la estructura cristalográfica de varias enzimas de esta familia y de sus mutantes, incluso en presencia de sustratos, productos, o inhibidores. Varela *et al.* (2000a) obtuvieron los primeros cristales de una AAO. Sin embargo, la estructura de éstos cristales no se pudo resolver, probablemente por la heterogeneidad de su glicosilación, por lo que se diseñó un sistema de expresión en *E. coli*, que permitió obtener cantidades elevadas de otra AAO desglicosilada (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2006) y determinar su estructura cristalográfica a 2,4 Å de resolución (PDB: 3FIM) (Fernández *et al.*, 2009). Esta estructura y la de la glucosa oxidasa de *A. niger* (PDB: 1CF3) (Wohlfahrt *et al.*, 1999) se utilizaron como moldes para generar el modelo molecular de la AAO del anamorfo de *B. adusta*. Se optó por utilizar estas dos flavoenzimas como moldes porque son las que presentan mayor identidad de secuencia con la AAO del anamorfo de *B. adusta* (45 y 29%, respectivamente), teniendo en cuenta únicamente las proteínas con estructura cristalográfica conocida.

En los siguientes apartados se describirán los aspectos más relevantes del modelo molecular de la AAO del anamorfo, en comparación con las estructuras cristalográficas de varias flavoenzimas. Mediante un alineamiento estructural, realizado con el modelo generado y con el servidor *Dali* (Holm y Park, 2000), se obtuvieron los valores de *Z-score* más elevados con la AAO de *P. eryngii*, la glucosa oxidasa de *A. niger*, la colina oxidasa de *A. globiformis* (PDB: 2JBV), la hidroxinitrilo liasa de *P. dulcis* (PDB: 1JU2), el dominio flavo de la celobiosa deshidrogenasa de *P. chrysosporium* (PDB: 1KDG), la piranosa 2-oxidasa de *T.*

multicolor (PDB: 1TT0) y la colesterol oxidasa de *Streptomyces* sp. (PDB: 1B4V) (52,3, 48,3, 47,6, 38,4, 34,8, 31,0 y 30,1, respectivamente). Los siguientes estudios comparativos se referirán a las enzimas de estas especies, siempre que no se indique lo contrario. Todas ellas pertenecen a la familia GMC de oxidorreductasas y presentan una topología general conservada a pesar de su diferente especificidad de sustrato. Las propiedades catalíticas de estas enzimas dependen principalmente de los residuos situados en el centro activo (de su capacidad para estabilizar al cofactor, a los sustratos y a los intermediarios, o de activar a los sustratos para favorecer la reacción, etc.). Por este motivo, se dedicará especial atención a la disposición de los residuos del centro activo del modelo de la AAO del anamorfo, así como a su exposición al solvente, sus interacciones con el cofactor y al papel que podrían desempeñar en la unión de los sustratos y en la catálisis.

4.3.4.2.1. Topología general

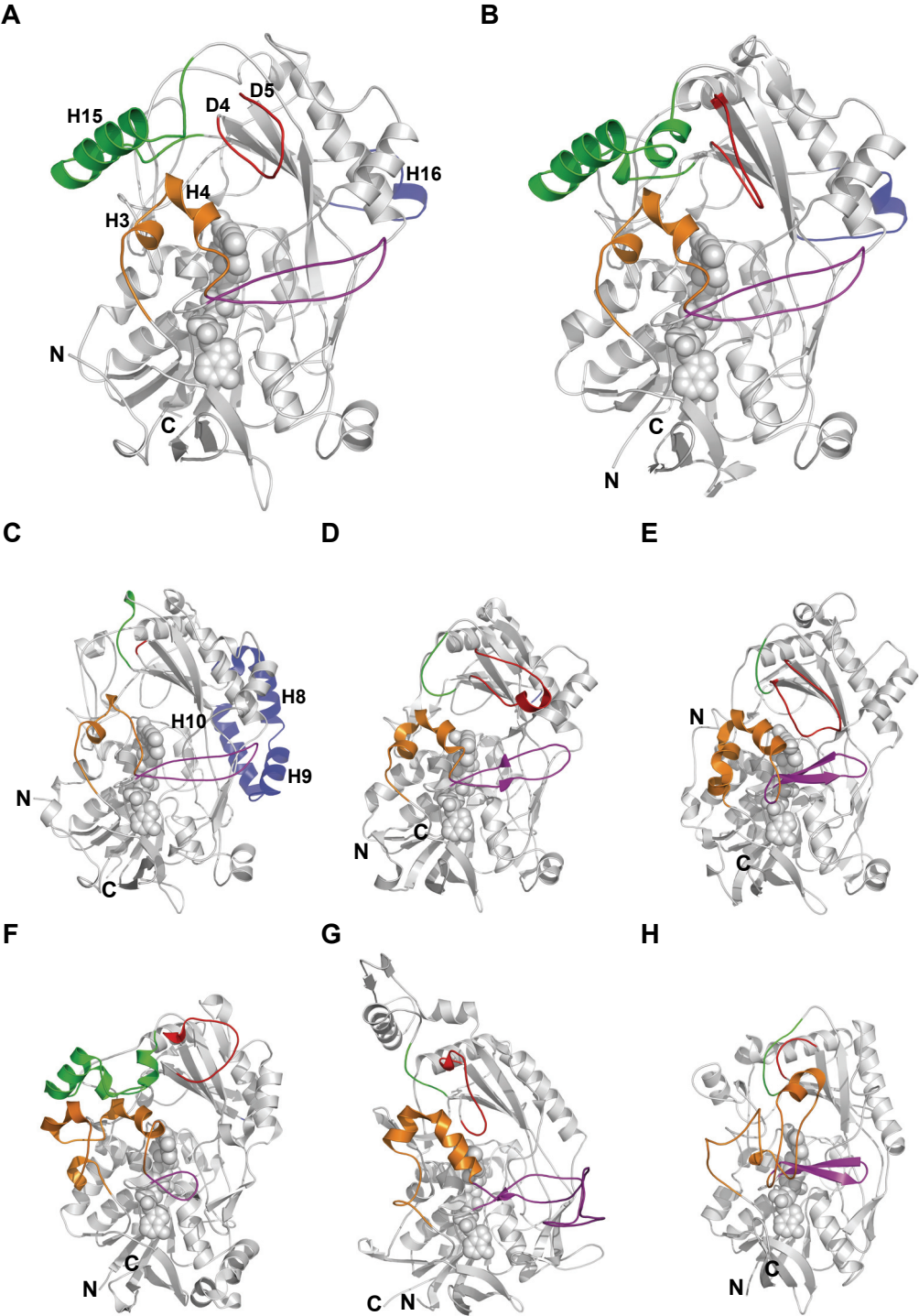
Como se ha mencionado anteriormente, la AAO del anamorfo es una glicoproteína monomérica de 579 aminoácidos, que contiene una molécula de FAD unida de forma no covalente. Según su modelo molecular, la apoproteína se pliega en torno al cofactor, configurando dos dominios principales, con distinta estructura y función. En el dominio de unión al sustrato se localiza la cavidad que aísla al anillo de isoaloxazina del solvente, mientras que en el dominio de unión al FAD se localiza el motivo de unión al ADP $\beta\alpha\beta$ (A1-H2-A2). La estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii* (Fernández *et al.*, 2009) presenta una topología y unas dimensiones ($\sim 70 \times 40\text{-}60$ Å) similares a las del modelo generado. En ambas AAO se observan los elementos estructurales conservados en la familia GMC de oxidorreductasas, aunque también incluyen características específicas (**Fig. 4.1**).

En el dominio de unión al FAD de la AAO del anamorfo, destaca una lámina β paralela (A), situada entre una lámina β mixta (F) y dos hélices α (H2 y H21). Esta estructura, basada en el dominio Rossmann de deshidrogenasas, la incluyen las demás enzimas de la misma familia y otras proteínas dependientes de FAD (Dym y Eisenberg, 2001). A diferencia de la AAO de *P. eryngii*, la AAO del anamorfo no incluye una lámina β adicional entre las hebras β F1 y F2 (lámina β B'). Esta lámina β tampoco se observa en otras enzimas de esta familia, como la glucosa oxidasa, colina oxidasa, hidroxinitrilo liasa, celobiosa deshidrogenasa, piranosa 2-oxidasa y colesterol oxidasa. Todas estas proteínas presentan los extremos N- y C-terminales en la superficie del dominio de unión al FAD y entre ellas varía notablemente la longitud de sus extremos N-terminales. Por ejemplo, la AAO del anamorfo de *B. adusta* incluye 13 aminoácidos más que la enzima de

P. eryngii y 12 menos que la hidroxinitrilo liasa. Otra diferencia entre estas AAO, en el dominio de unión al FAD, es que sólo la enzima de *P. eryngii* presenta un puente disulfuro que conecta las hebras β que equivalen a la F2 y a la F3 del anamorfo (C248-C263). La glucosa oxidasa, la hidroxinitrilo liasa y la celobiosa deshidrogenasa también presentan un puente disulfuro en posiciones diferentes, mientras que las demás flavoenzimas mencionadas no incluyen ninguno.

En cuanto al dominio de unión al sustrato, en todas las enzimas de esta familia está constituido por una larga lámina β antiparalela (D en el anamorfo) rodeada por varias hélices α . Sin embargo, el número y la longitud de estas hélices α y de otros elementos estructurales, varía entre los miembros de esta familia. La AAO del anamorfo de *B. adusta* y de *P. eryngii* tienen una elevada homología en este dominio, probablemente debido a que presentan una especificidad de sustrato similar. No obstante, se observan algunas diferencias entre ellas, como la longitud de una de las hélices α , situada en la región central, que consta de sólo 3 residuos en el anamorfo (H9, 187-189) y de 11 en *P. eryngii* (164-175). Además, esta última enzima presenta dos hélices α adicionales (residuos 328-331 y 351-353) que flanquean la hélice α homóloga a la H15 del anamorfo (**Fig. 4.1**, verde). En cuanto a las diferencias con otras enzimas, cabe destacar que ambas AAO presentan sólo una hélice α (H16 del anamorfo) entre 2 de las hebras β conservadas (D3 y D4 del anamorfo). Sin embargo, la glucosa oxidasa incluye 3 hélices α en la misma posición (H8, H9 y H10) y las demás enzimas no incluyen ninguna (**Fig. 4.1**, azul). Otras diferencias relevantes están relacionadas con elementos estructurales que restringen el acceso al centro activo (**Apartado 4.3.4.2.3**). Una característica común a todas las enzimas de esta familia, es la presencia de la tapa del FAD (residuos 71-93 del anamorfo) y de las regiones anteriores (hélices α H3 y H4 del anamorfo).

Fig. 4.1 (página siguiente). Comparación del modelo molecular de la AAO del anamorfo de *B. adusta* con las estructuras cristalográficas de varios miembros representativos de la familia GMC de oxidorreductasas. AAO del anamorfo de *B. adusta* (**A**), AAO de *P. eryngii* (PDB: 3FIM, **B**), glucosa oxidasa (PDB: 1CF3, **C**), colina oxidasa (PDB: 2JBV, **D**), hidroxinitrilo liasa (PDB: 1JU2, **E**), dominio flavo de la celobiosa deshidrogenasa (PDB: 1KDG, **F**), piranosa 2-oxidasa (PDB: 1TT0, **G**) y colesterol oxidasa (PDB: 1B4V, **H**). El FAD se representa como esferas. En todas las proteínas se destacan, con los mismos colores, las regiones que corresponden a los elementos estructurales de la AAO del anamorfo de *B. adusta* que se indican a continuación: **naranja**, hélices α H3 y H4; **morado**, tapa del FAD; **verde**, región que contiene la hélice α H15; **azul**, hélice α H16 (ocupa la misma posición que un fragmento de la H8 de la glucosa oxidasa); y **rojo**, región comprendida entre las hebras β D4 y D5. La longitud de estas regiones se ha determinado mediante un alineamiento estructural con el servidor *Dali* (Holm y Park, 2000) y las figuras se han realizado con *PyMOL v0.99*.



4.3.4.2.2. Entorno del FAD

En el interior del dominio de unión a los sustratos de la AAO del anamorfo, se localiza una cavidad que es adyacente a la cara *re* del anillo de isoaloxazina. Esta cavidad no está expuesta al solvente y se conecta con la superficie de la proteína mediante un estrecho canal. La cavidad está delimitada por varios residuos hidrofóbicos (A91, F104, I511, W512, P514, P558 y M559) y por dos His (H513 e H557). Además, en las proximidades de la H557 se sitúan dos residuos ácidos (E106 y E400). En la estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii*, se observa la misma exposición al solvente del centro activo y una cavidad similar con un volumen aproximado de 165 Å³ (Fernández *et al.*, 2009). El cofactor y las correspondientes His (H502 e H546) se sitúan como en la AAO del anamorfo y se observa una molécula de agua que establece puentes de hidrógeno con el N⁵ del anillo de isoaloxazina y el N^{ε2} de la H502. El E389 de esta enzima equivale al E400 de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, mientras que la V94 de la AAO de *P. eryngii* ocupa la misma posición que el E106 del anamorfo. De los siete residuos hidrofóbicos que delimitan la cavidad de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, cinco de ellos están reemplazados por el mismo residuo o por uno de la misma naturaleza en la AAO de *P. eryngii* (P79, Y92, I500, F501 y P503, respectivamente), mientras que la P558 y la M559 del anamorfo corresponden a los residuos polares T547 y Q548 de *P. eryngii*.

Además de en la AAO de *P. eryngii*, la H513 de la AAO del anamorfo está conservada en los demás miembros de la familia GMC de oxidorreductasas (H516, H466, H459, H689, H548, e H447 en la glucosa oxidasa, colina oxidasa, hidroxinitrilo liasa, celobiosa deshidrogenasa, piranosa 2-oxidasa y colesterol oxidasa, respectivamente). En cuanto a la otra His (H557 de la AAO del anamorfo), está conservada en la glucosa oxidasa y la hidroxinitrilo liasa (H559 e H497, respectivamente). Sin embargo, la H557 está reemplazada por una Asn en la colina oxidasa, celobiosa deshidrogenasa, piranosa 2-oxidasa y colesterol oxidasa (N510, N732, N593 y N485, respectivamente). Los mutantes, de estos residuos, presentan menos actividad que las enzimas nativas, lo que indica que participan en la unión de los sustratos y/o en la catálisis (Ferreira *et al.*, 2006; Witt *et al.*, 2000; Ghanem y Gadda, 2005; Rungsruriyachai y Gadda, 2008; Dreveny *et al.*, 2009; Rotsaert *et al.*, 2003b; Yue *et al.*, 1999; Lyubimov *et al.*, 2009). En concordancia con estos resultados, el sustrato de la AAO de *P. eryngii* se sitúa equidistante entre las dos His conservadas, en la proximidades del N⁵ del anillo de isoaloxazina (< 4 Å), según estudios de *docking* con diferentes alcoholes (Ferreira *et al.*, 2006). Una disposición similar se observa en los sustratos, inhibidores o productos de reacción, complejados con las estructuras cristalográficas de las demás enzimas mencionadas, a excepción de la

hidroxinitrilo liasa (Wohlfahrt *et al.*, 2004; Hallberg *et al.*, 2003; Bannwarth *et al.*, 2006; Quaye *et al.*, 2008; Li *et al.*, 1993).

La presencia de residuos aromáticos en el centro activo se ha descrito en las estructuras cristalográficas de varias flavoenzimas incluidas en diferentes familias (Mattevi *et al.*, 1997; Quaye *et al.*, 2008; Mattevi *et al.*, 1996). Como se ha mencionado anteriormente, el modelo molecular de la AAO del anamorfo de *B. adusta* incluye la F104 y el W512 en las proximidades del anillo de isoaloxazina (Y92 y F501 en *P. eryngii*). Además de las AAO, la mayoría de las enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas presentan un residuo aromático en la posición del W512 (Tyr en la glucosa oxidasa, colina oxidasa y colesterol oxidasa y Trp en la hidroxinitrilo liasa). Estudios de mutagénesis dirigida del residuo F501 en la AAO de *P. eryngii*, han demostrado que la presencia de un residuo aromático en esta posición es esencial y que influye principalmente en la velocidad de oxidación y en el potencial redox de la enzima (Ferreira *et al.*, 2006; Munteanu *et al.*, 2008). En las demás proteínas mencionadas no se han realizado mutantes de los correspondientes residuos. En cuanto a la F104 de la AAO del anamorfo, en la misma posición sólo presentan residuos aromáticos las AAO del género *Pleurotus*, otras AAO hipotéticas y las metanol oxidasas (Tyr las AAO de *Pleurotus* spp. y de *L. bicolor* y Phe la AAO de *P. chrysosporium* y las metanol oxidasas de *P. angusta* y de *C. boidinii*). Sin embargo, la glucosa oxidasa, la colina oxidasa, la hidroxinitrilo liasa y la celobiosa deshidrogenasa, presentan un residuo aromático muy próximo a la F104 de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (Y68, W61, F72 y F278, respectivamente). El mutante Y92A de la AAO de *P. eryngii* es inactivo, mientras que el Y92F presentó propiedades catalíticas similares a la enzima nativa (Ferreira *et al.*, 2006). El W61 de la colina oxidasa participa en la estabilización del grupo trimetilamonio de la colina (Quaye *et al.*, 2008), mientras que la Y68 de la glucosa oxidasa influye en la orientación y la velocidad de oxidación de la β -D-glucosa (Wohlfahrt *et al.*, 1999; Witt *et al.*, 2000).

Varias oxidasas de la familia GMC de oxidorreductasas incluyen un residuo ácido con una posición similar a la del E400 de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (E389 de la AAO de *P. eryngii*). En la estructura cristalográfica de la glucosa oxidasa, este residuo corresponde al E412 y forma un puente de hidrógeno con la H559 (Wohlfahrt *et al.*, 1999). De igual modo en la colesterol oxidasa, el E361 interacciona con la N485 (análoga a la H559) para facilitar la oxidación del sustrato (Li *et al.*, 1993; Kass y Sampson, 1998a). La colina oxidasa también incluye un residuo ácido en el centro activo (E312), aunque con diferente disposición y función. Estudios de mutagénesis y de *docking* indican que el E312 es clave para la unión y el posicionamiento correcto de la colina

(interacciona electrostáticamente con la carga positiva de este sustrato) (Quaye *et al.*, 2008). En el caso de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, el átomo O^{e2} del E400 está situado a 3,28 Å del átomo N^{e2} de la H557, de forma similar a las dos primeras oxidoreductasas mencionadas. Por tanto, es posible que el residuo ácido E400 influya en el estado de protonación de la H557 o que participe en la estabilización de su carga positiva. Sin embargo, la AAO del anamorfo de *B. adusta* es la única enzima de la familia GMC de oxidoreductasas que incluye otro residuo ácido en el centro activo, el E106. El átomo O^{e1} del E106 está situado a tan sólo 2,61 Å del átomo N^{e2} de la H557. Este residuo ácido está reemplazado por una Val en las AAO del género *Pleurotus*, de *L. bicolor* (JGI: 252336) y de *P. placenta* (JGI: 55496) y por una Ala en la AAO de *P. chrysosporium* (JGI: 135972). Como se mencionó anteriormente, la vainillil-alcohol oxidasa también presenta un residuo ácido en el centro activo (D170), que participa en la catálisis (además de favorecer la formación del enlace covalente entre la apoproteína y el cofactor) (van den Heuvel *et al.*, 2000). Sin embargo, este residuo está localizado a tan sólo 3,5 Å del átomo N⁵ del anillo de isoaloxazina (Mattevi *et al.*, 1997), mientras que el E106 de la AAO del anamorfo de *B. adusta* se sitúa a 6,1 Å del mismo átomo.

Como se mencionó anteriormente, los residuos polares T547 y Q548 de la AAO de *P. eryngii*, ocupan la misma posición que los hidrofóbicos P558 y M559 de la enzima del anamorfo, respectivamente. Estos residuos se localizan muy próximos al anillo de isoaloxazina (~ 2,5-4,5 Å) y al sitio de unión de los sustratos determinado en la AAO de *P. eryngii* mediante *docking* (Ferreira *et al.*, 2006). Por tanto, estos residuos podrían influir en la diferente afinidad de ambas AAO por los sustratos clorados, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante los análisis de QSAR (**Apartado 4.3.3.1**). En la posición de la P558, las demás enzimas mencionadas de la familia GMC de oxidoreductasas también incluyen un residuo hidrofóbico (Val la glucosa oxidasa y Pro las demás). Sin embargo, la M559 sólo está conservada en la glucosa oxidasa (M561), mientras que la colesterol oxidasa presenta una Phe y el resto de las enzimas tienen residuos polares (Asn, Gln o Thr).

En la estructura cristalográfica de la AAO de *P. eryngii* se han descrito 18 puentes de hidrógeno entre la apoproteína y el FAD (Fernández *et al.*, 2009). Los residuos que participan en estas interacciones están conservados en la AAO del anamorfo de *B. adusta*, a excepción de la Y92, V94, T547 y Q548. Como se acaba de mencionar, la Y92 está reemplazada en la AAO del anamorfo por otro residuo aromático (F104), mientras que las posiciones de los demás residuos están ocupadas por residuos de distinta naturaleza (E106, P558 y M559, respectivamente). Es probable que ambas AAO presenten las mismas

interacciones, de acuerdo con su homología estructural. Sin embargo, el E106 y la P558 de la AAO del anamorfo podrían interaccionar con el átomo O² del anillo de isoaloxazina (a diferencia de los correspondientes residuos de la AAO de *P. eryngii*), según los resultados obtenidos con el programa PyMOL v0.99.

4.3.4.2.3. Canal de acceso de los sustratos al centro activo

Para acceder a la cavidad donde se localiza el centro activo hipotético de la AAO del anamorfo, el sustrato atraviesa un canal delimitado por varios residuos hidrofóbicos y dos residuos ácidos (**Fig. 4.2**). El acceso a este canal está restringido por 3 elementos estructurales: **i**) las hélices α H3 y H4 (residuos 50-70) y su región posterior (tapa del FAD, 71-93); **ii**) la hélice α H15 y varios residuos adyacentes a ambos extremos (337-369); y **iii**) la región comprendida entre las hebras β D4 y D5 (406-419).

La tapa del FAD y las hélices α anteriores, están presentes en todas las oxidorreductasas de la familia GMC, aunque con distinta longitud y conformación (**Fig. 4.1**, morado y naranja, respectivamente). El número de residuos que constituyen estas regiones es similar en las AAO, la glucosa oxidasa, la colina oxidasa y la hidroxinitrilo liasa. La colesterol oxidasa y la celobiosa deshidrogenasa presentan tapas del FAD más reducidas y hélices α anteriores más extensas, mientras que en la piranosa 2-oxidasa ambas regiones son amplias (**Tabla 4.2**). En estas regiones se localizan residuos que conectan las cadenas polipeptídicas de las enzimas oligoméricas (Quaye *et al.*, 2008; Hecht *et al.*, 1993; Hallberg *et al.*, 2002; Hallberg *et al.*, 2004). En el caso de la enzima monomérica colesterol oxidasa, estudios cristalográficos han revelado que la conformación de varios residuos situados en la región anterior a la tapa del FAD, es diferente en ausencia y presencia del sustrato (residuos 78-87) (Li *et al.*, 1993; Yue *et al.*, 1999). Estos estudios indican que esta región es muy flexible y que forma parte de la puerta de acceso del sustrato al centro activo de la colesterol oxidasa.

Una región equivalente a la hélice α H15 del modelo de la AAO del anamorfo de *B. adusta* sólo se ha descrito en la AAO de *P. eryngii* (Fernández *et al.*, 2009) y en el dominio flavo de la celobiosa deshidrogenasa (Hallberg *et al.*, 2002) (**Fig. 4.1**, verde). Sin embargo, la AAO del anamorfo, a diferencia de las otras enzimas, no presenta una hélice α flanqueando ambos extremos de la hélice α H15. Como se muestra en el alineamiento de la **Fig. 3.37**, otras AAO y las metanol oxidasas incluyen, probablemente, una región homóloga. Resulta interesante, que las tres enzimas que presentan este elemento estructural participan en la degradación de materiales lignocelulósicos en los ecosistemas terrestres. Sin embargo, no se observa una estructura equivalente en la piranosa

2-oxidasa, que también está implicada en este proceso de biodegradación (Hallberg *et al.*, 2004).

Tabla 4.2. Extensión de la tapa del FAD y de su región anterior en diferentes enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas.

Enzima	Región anterior		Tapa	
	Residuos	Longitud	Residuos	Longitud
AAO <i>B. adusta</i> (anamorfo)	50-70	22	71-93	23
AAO <i>P. eryngii</i>	37-58	22	59-81	23
Glucosa oxidasa	54-75	22	76-97	22
Colina oxidasa	48-68	21	69-90	22
Hidroxinitrilo liasa	59-81	23	82-100	19
Colesterol oxidasa	44-94	51	95-109	15
Celobiosa deshidrogenasa	250-288	39	289-299	11
Piranosa 2-oxidasa	80-109	30	110-158	49

A excepción de la glucosa oxidasa, todas las enzimas mencionadas incluyen una región, que equivale a la región comprendida entre las hebras β D4 y D5 de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (**Fig. 4.1**, rojo). En el caso de la colesterol oxidasa, esta región consta sólo de 6 residuos y no restringe el acceso del sustrato al centro activo. Sin embargo, en las demás enzimas su longitud es de 14-23 residuos y cubre, en mayor o en menor grado, la flavina. En la piranosa 2-oxidasa, diversos estudios cristalográficos indican que cambios conformacionales de esta región modulan el acceso de los sustratos al centro activo (Hallberg *et al.*, 2004; Kujawa *et al.*, 2006; Bannwarth *et al.*, 2006). Estos resultados son consistentes con los obtenidos recientemente en la colina oxidasa, utilizando simulaciones de dinámica molecular y browniana (Xin *et al.*, 2009). Según estos estudios computacionales, la disposición de cinco residuos hidrofóbicos determina la apertura y el cierre del canal de acceso del sustrato (M62, L65, V355, F357 y M359), estando tres de ellos localizados en la región homóloga a la región comprendida entre las hebras β D4 y D5 de la AAO del anamorfo (**Fig. 4.1**, rojo). Los residuos equivalentes a estos 5 residuos de la colina oxidasa también son hidrófobos en la AAO del anamorfo de *B. adusta* (L63, L66, W407, P409 y V411, respectivamente), mientras que en la AAO de *P. eryngii* únicamente uno de ellos es polar (P51, V54, Q395, F397 y I401, respectivamente). El mutante de uno de estos cuatro residuos hidrófobos de la AAO de *P. eryngii* (I401A), presentó menos actividad que la enzima nativa (Ferreira *et al.*, 2004). Otros estudios de mutagénesis adicionales, en ambas AAO, serían necesarios para evaluar la función de los demás residuos hidrófobos mencionados en la actividad catalítica de estas enzimas.

En las proximidades de estos residuos, se sitúan otros residuos hidrofóbicos para configurar el canal de conexión entre el anillo de isoaloxazina y la superficie de la AAO del anamorfo de *B. adusta* (V62, P67, F68, P87, I88, P89, A91, V102, F104, F343, I413, P414, P415, A416, G418, I511, W512 y P514) (**Fig. 4.2**). Entre éstos, destacan la F104 y el W512, que son residuos adyacentes al anillo de isoaloxazina y representan el cuello de botella para el acceso del sustrato. Como se mencionó anteriormente, estudios de mutagénesis dirigida con los dos residuos equivalentes de la AAO de *P. eryngii* (Y92 y F501, respectivamente) han revelado que la presencia de residuos aromáticos en estas posiciones es esencial para su actividad (Ferreira *et al.*, 2006). Los demás residuos hidrofóbicos del canal de acceso de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, están reemplazados en la AAO de *P. eryngii* por residuos idénticos o similares, a excepción de 4 residuos (F68, P87, I413 y A416 de la AAO del anamorfo que corresponden a N56, S75, R403 y D405 de la AAO de *P. eryngii*, respectivamente). Este canal hidrofóbico probablemente facilita que los sustratos reductores de las AAO alcancen el centro activo y se liberen los productos correspondientes. Además, el acceso del O₂ y la liberación del H₂O₂ también puede estar regulada por canales de naturaleza hidrofóbica, como se ha demostrado en la colesterol oxidasa tipo I utilizando estudios de mutagénesis (Chen *et al.*, 2008). Sin embargo, no se puede descartar que en las AAO existan múltiples canales para la difusión del O₂ que convergerían en el centro activo, como se ha observado en otras flavoenzimas mediante análisis computacionales y experimentales (Baron *et al.*, 2009).

Como se acaba de mencionar, el canal de acceso de los sustratos al centro activo de la AAO de *P. eryngii* y del anamorfo de *B. adusta* es de naturaleza hidrofóbica. Sin embargo, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta dos residuos ácidos que delimitan el canal (E64 y E410), a diferencia de la enzima de *P. eryngii* (con G52 e H398 en las posiciones correspondientes, respectivamente). Sin embargo, otras enzimas de la misma familia incluyen residuos ácidos en la misma posición que los de la AAO del anamorfo de *B. adusta*. Así, el E64 de la AAO del anamorfo equivale en la glucosa oxidasa y la colina oxidasa a D70 y E63, respectivamente. Además, la colina oxidasa incluye el D358, en la misma posición que el E410 de la AAO del anamorfo. En la colina oxidasa se ha descrito que los residuos ácidos mencionados y otros adicionales próximos, facilitan que la colina (sustrato cargado positivamente) alcance el centro activo (Xin *et al.*, 2009). Los sustratos de las AAO descritos hasta el momento no presentan carga positiva. Sin embargo, los residuos ácidos podrían facilitar que la *p*-metoxibencilamina (protonada a pH 6,0) sea inhibidor

competitivo de la AAO del anamorfo, a diferencia de la enzima de *P. eryngii* (Ferreira *et al.*, 2005).

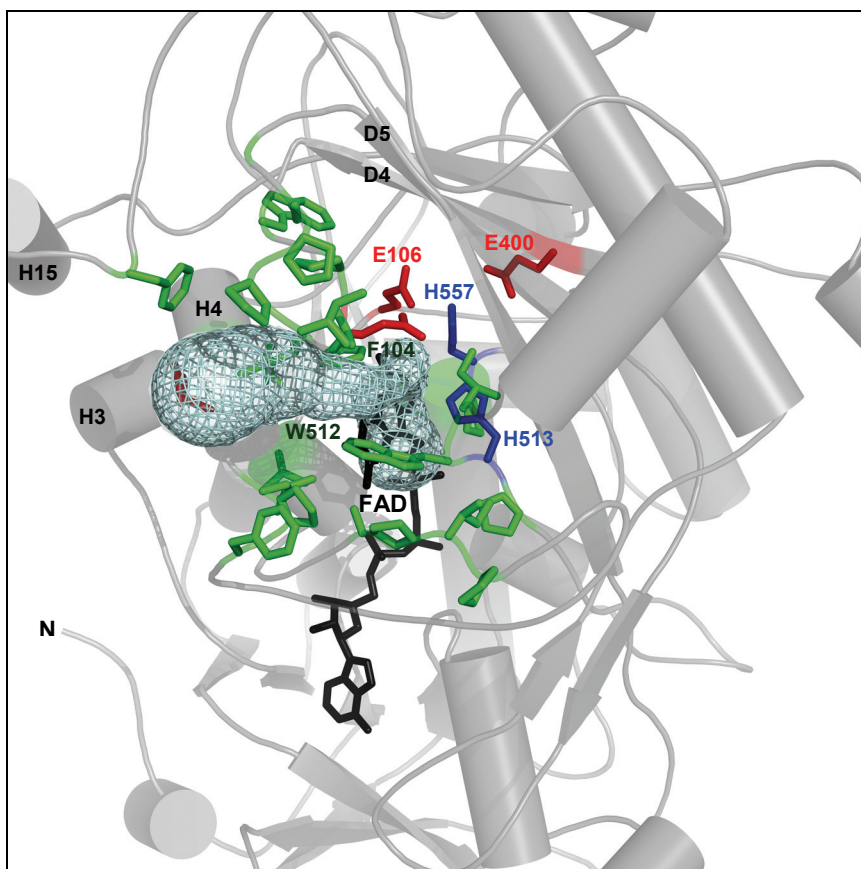


Fig. 4.2. Canal hipotético de acceso del sustrato al centro activo en el modelo de la AAO del anamorfo de *B. adusta*. Se destacan los residuos hidrofóbicos (verde), las His (azul), los residuos ácidos (rojo) y el FAD (negro). La superficie de acceso (cian) se calculó con el programa CAVER (Petrek *et al.*, 2006) y se representó con PyMOL v0.99. Se rotulan las hélices α H3, H4 y H15, las hebras β D4 y D5 y el N-terminal (N).

4.3.5. Mecanismo catalítico

4.3.5.1. Características generales

Entre las flavoenzimas más estudiadas figuran la glucosa oxidasa, la colesterol oxidasa, la colina oxidasa y la metanol oxidasa. Como se ha mencionado anteriormente, todas ellas se agrupan en la familia GMC de oxidorreductasas, en base a una comparación de sus secuencias aminoacídicas (Cavener, 1992). Estas enzimas presentan en el dominio de unión a los sustratos una identidad de

secuencia baja, pero incluyen en el centro catalítico varios residuos conservados y además sus estructuras tridimensionales son similares. Esto sugiere que podrían presentar un mecanismo catalítico común (Fitzpatrick, 2001).

La gran versatilidad del anillo de isoaloxazina implica que haya varios mecanismos viables para las reacciones catalizadas por las flavoenzimas. Entre los diferentes mecanismos considerados para las proteínas de la familia GMC de oxidorreductasas (**Apartado 1.2.6**), el más aceptado consiste en la transferencia del anión hidruro desde el C- α del alcohol hasta el N⁵ del anillo de isoaloxazina. Es probable, que este mecanismo implique la activación del sustrato mediante la transferencia del protón del hidroxilo a un residuo del centro activo, con la consiguiente formación de un alcóxido (Fitzpatrick, 2007).

Estudios de efecto isotópico realizados con la glucosa oxidasa y la colesterol oxidasa, sugieren que la ruptura del enlace OH precede a la del enlace CH. Sin embargo, la complejidad cinética de ambas flavoenzimas no permite descartar otras posibilidades (Bright y Gibson, 1967; Kass y Sampson, 1998a; Kass y Sampson, 1998b). En otras enzimas de la misma familia, como la metanol oxidasa y la colina oxidasa, estudios similares han demostrado inequívocamente que la reacción se inicia con la activación del sustrato y posteriormente se produce la transferencia del hidruro, con la consiguiente estabilización del intermediario alcóxido (Menon *et al.*, 1995; Fan y Gadda, 2005). Sin embargo, Ferreira *et al.* (2009) han revelado recientemente que en la AAO de *P. eryngii*, se produce sincrónicamente la ruptura de ambos enlaces del alcohol, de acuerdo con los efectos isotópicos calculados. Además, se ha obtenido el mismo resultado utilizando aldehídos como sustratos de esta AAO (Ferreira *et al.*, 2010). Como se ha expuesto en apartados anteriores, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta propiedades físicoquímicas, estructurales y de especificidad de sustrato similares a las de la AAO de *P. eryngii*. Esto sugiere que ambas AAO presentan un mecanismo catalítico común. Los resultados analizados en los siguientes apartados, relacionados con el efecto del pH y la reacción con el O₂, apoyan esta hipótesis.

4.3.5.2. Efecto del pH en la oxidación

Como las demás AAO caracterizadas hasta el momento, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presenta más actividad a valores de pH próximos a 5,0-6,0 (utilizando veratrílico, *p*-anisílico y vainillílico como sustratos modelo). Por el contrario, las vainillil-alcohol oxidasas son más eficaces a pH básicos, debido a que la forma fenolato del sustrato está implicada en la catálisis y favorece la formación del intermediario *p*-quinona metiluro (Fraaije y van Berkel, 1997). En el caso de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, no es probable que opere este

mecanismo para la oxidación de vainillílico, puesto que con esta AAO no aumentó la velocidad de la reacción a pH básicos como consecuencia de la desprotonación del hidroxilo fenólico de este alcohol. Los análisis de QSAR realizados con la AAO del anamorfo de *B. adusta* indicaron que influyen los mismos parámetros fisicoquímicos en la oxidación de los alcoholes fenólicos y los no fenólicos catalizada por esta enzima (**Apartado 4.3.3**). Esto sugiere que la AAO del anamorfo utiliza el mismo mecanismo catalítico para oxidar ambos tipos de sustratos.

Utilizando el alcohol *p*-anisílico y el vainillílico, como sustratos de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, los valores de k_{cat}/K_m versus pH se ajustaron a una curva acampanada. Esto es consistente con la participación de dos grupos ionizables en la catálisis (uno desprotonado y otro protonado). Estos grupos presentan valores de pK_a similares en el caso del alcohol fenólico ($\sim 2,3$ y $8,2$) y del no fenólico ($\sim 2,2$ y $8,7$), lo que sugiere que participan los mismos residuos en la oxidación de ambos compuestos. Para representar los valores de k_{cat} en función del pH, se podría utilizar la misma ecuación que para la k_{cat}/K_m . Sin embargo, en el caso del *p*-anisílico, el análisis estadístico indica que el ajuste es ligeramente mejor si se utiliza una curva de pendientes 0 y -1. Para este tipo de ensayos, el *p*-anisílico es menos adecuado que el vainillílico, debido a que es oxidado rápidamente por la enzima. Esto podría explicar la ambigüedad de los resultados obtenidos en este caso. En cuanto a la afinidad, es independiente del pH con el vainillílico, mientras que la unión del *p*-anisílico está favorecida por un residuo protonado con un pK_a próximo a 8,4.

El pK_a ácido podría corresponder a la base catalítica, que es necesaria para la activación del sustrato. El pK_a básico podría ser de un residuo que facilita la unión y el posicionamiento del sustrato para la catálisis. Recientemente, Ferreira *et al.* (2009) realizaron un estudio similar con la AAO de *P. eryngii* utilizando *p*-anisílico como sustrato, en el rango de pH 4,0-8,5. En este caso, la representación de la V_{max} versus pH indica que un residuo protonado con un pK_a próximo a 8,5 facilita la catálisis. Previamente, se obtuvieron resultados similares en la celobiosa deshidrogenasa y la colesterol oxidasa (Rotsaert *et al.*, 2003b; Kass y Sampson, 1998a). En esta última enzima, el residuo con pK_a básico podría ser la H447 (conservada en todos los miembros de la familia), puesto que estudios cristalográficos revelaron que este residuo está protonado a pH 4,5-7,3 y desprotonado a pH 9,0 (Lyubimov *et al.*, 2006) y, por tanto, podría participar en el posicionamiento del sustrato, formando un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo (Sampson y Vrielink, 2003). Sin embargo, en el caso de la celobiosa deshidrogenasa, los mutantes de la correspondiente His (H689) exhiben una dependencia del pH similar a la enzima

nativa y presentan un valor significativamente inferior de k_{cat} y similar de K_m . Por tanto, se ha propuesto que este residuo se encuentra desprotonado y actúa de base catalítica (Rotsaert *et al.*, 2003b). Esta podría ser la función de la His equivalente en la AAO del anamorfo y de *P. eryngii* (H513 e H502, respectivamente). Como se mencionó anteriormente (**Apartado 4.3.2**), las AAO no estabilizan el ión sulfito, la semiquinona aniónica, ni el alcóxido. Esto sugiere que la His mencionada en ambas AAO, situada en las proximidades del $\text{N}^1\text{-C}^2 = \text{O}$ de la flavina, se encuentra desprotonada. Además, el mutante H502S presenta una k_{cat} inferior (400 veces) y una K_m similar a la enzima nativa (Hernández-Ortega *et al.*, 2008). Sin embargo, el $\text{p}K_{\text{a}1}$ de la AAO del anamorfo de *B. adusta* es demasiado ácido para corresponder a una His, aunque se ha demostrado que los residuos del entorno pueden modificar considerablemente los $\text{p}K_{\text{a}}$ de los aminoácidos en solución (Lyubimov *et al.*, 2006). Contrariamente, estudios similares en la colina oxidasa indican que participa en la catálisis un residuo desprotonado con un $\text{p}K_{\text{a}}$ de $\sim 7,5$. En este caso, ninguna de las dos His situadas en el centro activo actúa de base catalítica (H466 e H351) puesto que los mutantes, en los que se ha reemplazado una de estas His, presentan la misma dependencia por el pH que la enzima nativa. En vista de estos resultados, se puede concluir que en las diferentes enzimas de la familia GMC de oxidorreductasas difiere la función de las His conservadas en el centro activo. En el caso de la AAO del anamorfo de *B. adusta*, la H513 podría actuar de base catalítica, mientras que la H557 podría participar en la estabilización y posicionamiento del sustrato. Sin embargo, es necesario dilucidar el efecto del pH en los correspondientes mutantes para determinar la validez de esta hipótesis.

4.3.5.3. Reacción con el O_2 : mecanismo secuencial o *ping-pong*

La oxidación de los sustratos catalizada por la AAO del anamorfo consiste en dos semi-reacciones (**Fig. 4.3**). En la primera, el FAD se reduce a su forma hidroquinona al adquirir un hidruro del sustrato orgánico (semi-reacción de reducción). En la segunda, el cofactor se oxida mediante la transferencia del hidruro al O_2 y se forma H_2O_2 (semi-reacción de oxidación). Utilizando los alcoholes vainillílico, *m*-fluorobencílico y *m*-clorobencílico, como sustratos reductores, estas semi-reacciones cursan de forma independiente, puesto que la reoxidación de la enzima no se produce hasta que se ha liberado, de su centro activo, el producto orgánico de la reacción (mecanismo *ping-pong*). Este mecanismo se ha puesto de manifiesto mediante la representación de dobles-recíprocos de las velocidades iniciales (a diferentes concentraciones de alcohol y de O_2), en la que se observan varias líneas paralelas (**Fig. 3.25B, C y D**). En el caso del alcohol *p*-anisílico, el complejo formado entre la enzima reducida y el

producto orgánico, es el que reacciona con el O_2 para liberar H_2O_2 . Finalmente, se libera del centro activo de la enzima oxidada el *p*-anisaldehído (mecanismo ternario). Esto se traduce mediante la correspondiente representación de doubles-recíprocos, en varias líneas que convergen a la izquierda del eje de ordenadas (**Fig. 3.25A**). En el caso de la AAO de *P. eryngii*, se han obtenido resultados similares con el alcohol *p*-anisílico (Ferreira *et al.*, 2009) y con los demás sustratos (Ferreira *et al.*; resultados no publicados).

Como se mencionó anteriormente (**Apartado 4.3.3**), elevados valores del parámetro fisicoquímico MR de los sustituyentes del anillo bencénico, tienen un efecto positivo sobre los valores de k_{cat} de la AAO del anamorfo de *B. adusta* y de *P. eryngii*. El grupo metoxilo, del alcohol *p*-anisílico, presenta valores de MR superiores a los de los sustituyentes de los demás alcoholes utilizados en las cinéticas bisustrato (MR de OCH_3 , Cl, OH y F es 7,87, 6,03, 2,85 y 0,92, respectivamente). Cuanto mayor es el valor de MR, mayor es la polarizabilidad electrónica y las fuerzas de dispersión generadas. Este tipo de interacciones podría estabilizar al alcohol *p*-anisílico en el centro activo de la enzima y favorecer el mecanismo ternario, a diferencia de los alcoholes con valores inferiores de MR.

Se han descrito otras flavoenzimas en las que el mecanismo cinético también depende de la naturaleza del sustrato. La vainillil-alcohol oxidasa presenta un mecanismo ternario utilizando *p*-(metoximetil)fenol como sustrato. Sin embargo, durante la reacción de oxidación del vainillílico, catalizada por esta enzima, se forma un intermediario *p*-quinona metiluro menos estable y se ha descrito que la reacción podría cursar mediante un mecanismo de tipo *ping-pong* (Fraaije y van Berkel, 1997). Además, en la vainillil-alcohol oxidasa se ha comprobado la influencia de los residuos del centro activo en el mecanismo catalítico mediante estudios de mutagénesis dirigida (van den Heuvel *et al.*, 2000). Recientemente, se ha demostrado en la piranosa 2-oxidasa que el mecanismo cinético también puede variar según el pH (Rungsrisuriyachai y Gadda, 2009). En otras flavoenzimas únicamente se han descrito mecanismos cinéticos ternarios, como en la colina oxidasa (Gadda, 2003) y la D-amino ácido oxidasa (Pilone, 2000), o de tipo *ping-pong*, como en la glucosa oxidasa (Gibson *et al.*, 1964) y la glicolato oxidasa (Pennati y Gadda, 2009).

La reactividad hacia el O_2 de las diferentes flavoenzimas varía considerablemente (Massey, 2002). La glucosa oxidasa se considera el “*Ferrari*” de las oxidasas, con una k_{cat}/K_m^B de $1,5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (Roth y Klinman, 2003). Sin embargo, la AAO del anamorfo de *B. adusta* presentó valores de k_{cat}/K_m^B más elevados con algunos de los sustratos ensayados ($0,8\text{--}2,4 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). En el caso del alcohol *p*-anisílico, este valor fue de $1,7 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, que es superior (~ 5

veces) al que se ha descrito en la AAO de *P. eryngii* con el mismo sustrato (Ferreira *et al.*, 2009). En la glucosa oxidasa la protonación de la His totalmente conservada (H516) es clave para la reducción del O₂ y por tanto la velocidad de la reacción disminuye a pH básicos (Roth y Klinman, 2003). Sin embargo, los valores de la k_{cat}/K_m^B de la AAO de *P. eryngii* y de la colina oxidasa son independientes del pH (Ferreira *et al.*, 2009; Ghanem *et al.*, 2003).

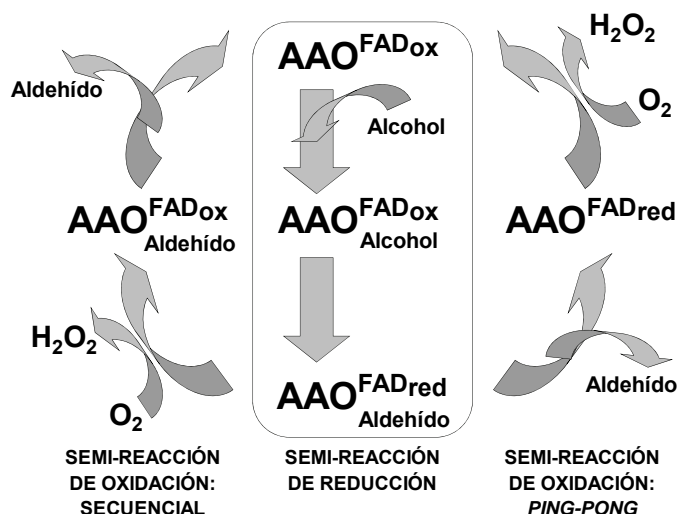


Fig. 4.3. Mecanismo cinético de la AAO del anamorfo de *B. adusta*. Dependiendo del alcohol utilizado como sustrato reductor, el correspondiente aldehído (producto de oxidación) se puede liberar del centro activo antes o después de la reoxidación de la AAO con O₂ (mecanismo *ping-pong* o secuencial, respectivamente).

4.4. MnP DEL ANAMORFO DE *B. adusta*

4.4.1. Producción, purificación y caracterización fisicoquímica

Como se mencionó anteriormente (**Apartado 1.1.3.2**), los basidiomicetos de podredumbre blanca secretan 3 tipos de hemo-peroxidasas ligninolíticas de alto potencial redox, denominadas LiP, MnP y VP (Gold *et al.*, 2000; Martínez, 2002; Cullen y Kersten, 2004). Las MnP utilizan Mn²⁺ como sustrato reductor, mientras que las LiP oxidan compuestos aromáticos no fenólicos de alto potencial redox (p. ej., veratrílico). Las VP se han descrito en diferentes cepas de *Pleurotus* y de *Bjerkandera* y en *C. unicolor* (Palma *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 1996; Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999; Camarero *et al.*, 1999; Sarkar *et al.*, 1997; Heinfling *et al.*, 1998a; Mester y Field, 1998; Wang *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2005; Rainio *et al.*, 2008) y probablemente son producidas también por otras especies fúngicas (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2009a). Estas peroxidasas catalizan la

oxidación de: **i)** los sustratos de las MnP y LiP; **ii)** colorantes de bajo potencial redox y compuestos fenólicos, como las peroxidasas genéricas (p. ej., HRP); y **iii)** compuestos aromáticos y colorantes de alto potencial redox, que las LiP sólo oxidan en presencia de mediadores (Heinfling *et al.*, 1998c; Kamitsuji *et al.*, 2005).

En *Bjerkandera* spp. se han caracterizado varias enzimas con actividad sobre Mn^{2+} , pero todas ellas se incluyen en el grupo de las VP (Palma *et al.*, 2000; Heinfling *et al.*, 1998a; Mester y Field, 1998; Wang *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2005). Además, no se ha clonado ningún gen que codifique una MnP de *Bjerkandera* spp., mientras que están disponibles varias secuencias de VP (GenBank: DQ060037.1, AY217015.1, EF570873.1) y también de LiP (GenBank: E03952.1). Utilizando el líquido de cultivo del anamorfo de *B. adusta* se purificaron dos peroxidasas con actividad sobre $MnSO_4$. Posteriormente, se comprobó que estas isoenzimas no oxidaban el RB5, ni otros sustratos característicos de las VP, y por consiguiente se incluyeron en el grupo de las peroxidasas que requieren Mn^{2+} para completar su ciclo catalítico, las MnP.

Para la producción y la purificación de las MnP secretadas por el anamorfo de *B. adusta*, se utilizó un medio líquido con glucosa, peptona y extracto de levadura. Se optó por este medio porque las concentraciones no limitantes de nitrógeno orgánico favorecen la producción de peroxidasas en *Bjerkandera* spp., según se ha descrito en diferentes estudios previos (Kimura *et al.*, 1990; Kaal *et al.*, 1993; Mester *et al.*, 1996). Esto distingue a las especies de este género del hongo ligninolítico modelo *P. chrysosporium*, que produce peroxidasas ligninolíticas en cultivo líquido sólo en condiciones limitantes de nutrientes (Gold y Alic, 1993). El medio de producción de las MnP del anamorfo, se suplementó con 500 μM de $MnSO_4$. Esta concentración es óptima para producir las MnP de esta especie fúngica, según los estudios de inducción realizados con diferentes concentraciones de este compuesto (0-1000 μM). Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en *P. chrysosporium* (Pérez y Jeffries, 1992; Brown *et al.*, 1991) y en otros hongos de podredumbre blanca (Bonnarme y Jeffries, 1990), en los que se ha descrito que la presencia de Mn en los cultivos también tiene un efecto positivo en los niveles de producción de MnP. La concentración óptima de $MnSO_4$ para inducir la producción de peroxidasas en *Bjerkandera* sp. BOS55 (Mester y Field, 1997) coincidió con la del anamorfo de *B. adusta* aislado del CD (500 μM) y se han detectado concentraciones similares en diferentes sustratos lignocelulósicos que probablemente favorecen la producción de estas peroxidasas en la Naturaleza (Mester *et al.*, 1998).

Además de la adición de Mn, la adición de diferentes ácidos orgánicos a los cultivos de *Bjerkandera* sp. BOS55 tuvo un efecto positivo en los niveles de

producción de peroxidasa (Mester y Field, 1997). En el líquido de cultivo del anamorfo de *B. adusta* se detectaron mediante HPLC diferentes ácidos orgánicos (oxálico, cítrico y acético). Es necesario confirmar estos resultados con otras técnicas, pero es probable que el anamorfo de *B. adusta* produzca estos compuestos, teniendo en cuenta que la síntesis *de novo* de ácidos carboxílicos ha sido descrita en muchas especies fúngicas ligninolíticas (Kuan y Tien, 1993; Dutton y Evans, 1996). Se han propuesto varias funciones para estos ácidos (Hofrichter, 2002; Kuan y Tien, 1993): **i)** modular el pH del ambiente; **ii)** facilitar la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , necesario para que se produzca la reacción de Fenton; **iii)** quelar cationes (p. ej., Fe, Ca); **iv)** liberar el Mn^{3+} del centro activo de la MnP; **v)** formar complejos difusibles con Mn^{3+} que oxidan una amplia variedad de compuestos (fenólicos, algunos no fenólicos de bajo potencial redox, aminas aromáticas, tioles y ácidos grasos insaturados); y **vi)** reaccionar con Mn^{3+} para formar radicales alquílicos, que reaccionan con O_2 generando otros radicales (p. ej, superóxido). En el caso del anamorfo de *B. adusta*, estos ácidos orgánicos podrían además participar en la solubilización de la capa metálica de los CD (**Apartado 4.2.2**).

Las diferentes especies fúngicas secretan generalmente varias isoformas de MnP, con diferentes valores de pI ácidos (3-4) (Hatakka, 2001). Así, en *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilb. & Ryvarden se han descrito hasta 11 isoformas diferentes (Urzúa *et al.*, 1995). Los pI de las diferentes peroxidosas de *Bjerkandera* spp., descritas hasta el momento, varían entre 3,35 y 4,2 (**Tabla 4.3**), mientras que los pI de la MnP III, IV y V de *P. chrysosporium* son iguales o superiores (4,9, 4,5 y 4,2, respectivamente) (Pease y Tien, 1992). En el caso del anamorfo de *B. adusta*, se purificaron dos isoformas, MnP1 y MnP2, con pI de 4,02 y 3,71, respectivamente. El proceso de purificación de estas proteínas incluyó tres pasos cromatográficos, con un rendimiento final para la MnP1 y MnP2 de 12,6 y 11,2%, respectivamente. Estos bajos rendimientos sugieren que las MnP del anamorfo de *B. adusta* no son muy estables en las condiciones utilizadas y sería conveniente optimizar el proceso de purificación para obtener mejores rendimientos. No obstante, cabe mencionar que para la purificación de las peroxidosas de otras especies de *Bjerkandera* se han descrito rendimientos similares o incluso inferiores (1,9-16,2%) (Palma *et al.*, 2000; ten Have *et al.*, 1998; Heinfling *et al.*, 1998a), a excepción de la VP de *B. adusta* UAMH 8258 y de la VPI de *Bjerkandera* sp. BOS55 con rendimientos de 24 y 46,8%, respectivamente (Wang *et al.*, 2002; Palma *et al.*, 2000).

En cuanto a la masa molecular de las MnP descritas hasta el momento, ésta oscila entre 38 y 62,5 kDa, aunque la mayoría de estas hemoproteínas presentan valores próximos a 45 kDa (Hofrichter, 2002). Este es el caso de las MnP del

anamorfo de *B. adusta*, cuyas masas moleculares fueron próximas a este valor, según los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE (~ 42 kDa). La comparación del valor determinado por esta técnica con el de cromatografía de exclusión molecular (~ 47 kDa), indicó que ambas isoformas son monoméricas, como las demás MnP descritas hasta el momento. Estos resultados son similares a los obtenidos en diferentes peroxidasas producidas por formas perfectas de *Bjerkandera* spp. (**Tabla 4.3**).

Los valores de las constantes cinéticas de estado estacionario obtenidos con la MnP1 y la MnP2 no coinciden exactamente aunque las dos proteínas oxidan los mismos sustratos (**Apartado 4.4.3**). Utilizando SDS-PAGE, se comprobó que su contenido en carbohidratos era similar (~ 7,0%) pero podría no ser idéntico, puesto que la técnica utilizada no es muy precisa, y éste podría ser el responsable de las ligeras diferencias observadas en sus propiedades catalíticas y en sus valores de pI. Sin embargo, en el caso de la VP de *P. eryngii*, la enzima recombinante expresada en *E. coli* (sin glicosilación) presenta propiedades catalíticas similares a las de la enzima secretada por el hongo (glicosilada) (Pérez-Boada *et al.*, 2002). Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados no se puede concluir inequívocamente que las isoformas producidas por el anamorfo correspondan a diferentes formas de glicosilación, porque también podrían ser el resultado de la expresión de diferentes genes o de la presencia de dos alelos distintos de un mismo gen como se ha descrito en otros basidiomicetos dicariontes (Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999).

Sin embargo, la secuencia de los extremos N-terminales de la MnP1 y la MnP2 del anamorfo son idénticas. Esto apoya la hipótesis de que estas peroxidasas son el resultado de diferentes procesos post-traduccionales aunque se requerirían estudios adicionales para confirmarlo. Se secuenciaron 21 aminoácidos, que incluyen 4 indeterminaciones. Los residuos no identificados en las posiciones 3, 15 y 16 probablemente corresponden a Cys, ya que estos residuos forman puentes disulfuro conservados en las peroxidasas fúngicas (Banci, 1997). Los extremos N-terminales de las MnP del anamorfo presentan la homología más elevada con la MnP1 de *Phlebia* sp. MG60 y con una LiP de *T. versicolor* (66% de identidad de secuencia). Previamente, otros autores constataron la elevada homología existente entre los N-terminales de las peroxidasas de diferentes cepas de *Bjerkandera* y de *T. versicolor* (Wang *et al.*, 2002; Mester y Field, 1998). Los extremos N-terminales de las MnP del anamorfo de *B. adusta* son similares a los de las peroxidasas de otras cepas del mismo género pero en ningún caso coinciden todos los residuos, lo que confirma la singularidad de las MnP objeto de estudio.

Tabla 4.3. Propiedades fisicoquímicas de las peroxidasas de *Bjerkandera* spp.

	Isoforma	M ¹ (kDa)	CH (%)	pI	Máximo (nm)	Referencia
(A) MnP						
<i>B. adusta</i> (anamorfo)	I	42	7,1	4,02	408, 506, 638	
	II	42	7,1	3,71	408, 506, 638	
(B) LiP						
<i>B. adusta</i>	II	41	n. d.	4,2	407, 508, 638	(Kimura <i>et al.</i> , 1990)
<i>Bjerkandera</i> sp. BOS55	II	40-42	n. d.	n. d.	407, 508, 638	(ten Have <i>et al.</i> , 1998)
	V	40-42	n. d.	n. d.	407, 508, 638	
(C) VP						
<i>Bjerkandera</i> sp. BOS55	I	45	4,5	3,45	n. d.	(Palma <i>et al.</i> , 2000)
	II	44	2,3	3,4	n. d.	
<i>Bjerkandera</i> sp. BOS55	I	43	n. d.	3,88	n. d.	(Mester y Field, 1998)
<i>B. adusta</i> DSM 11310	I	44	3	3,45	n. d.	(Heinfling <i>et al.</i> , 1998a)
	II	44	3	3,35	n. d.	
<i>B. adusta</i> UAMH 8258		43	n. d.	3,55	n. d.	(Wang <i>et al.</i> , 2002)
<i>Bjerkandera</i> sp. B33/3		45	n. d.	n. d.	407, 498, 640	(Moreira <i>et al.</i> , 2006)

¹Masa molecular determinada mediante SDS-PAGE.

4.4.2. Caracterización espectroscópica

Los espectros de absorción UV-Vis de las dos MnP del anamorfo, determinados en estado de reposo, son esencialmente idénticos. En éstos destaca una banda Soret a 408 nm (característica de hemoproteínas) y las bandas de transferencia de carga CT1 y CT2 a 506 y 638 nm, respectivamente (características del Fe³⁺ en estado de alto spin). Los espectros de absorción de la MnP y la LiP de *P. chrysosporium* (Mino *et al.*, 1988) son similares a los de las MnP del anamorfo y de otras cepas de *Bjerkandera* (Tabla 4.3). Esto sugiere que las peroxidasas de ambas especies presentan el Fe³⁺ en el mismo estado de coordinación y de spin (Iizuka y Yonetani, 1970). En las peroxidasas de *P. chrysosporium*, los estudios de espectroscopía UV-VIS, resonancia paramagnética electrónica y cristalografía sugieren que el Fe³⁺ está predominantemente hexacoordinado en estado de alto spin, con una molécula de H₂O como sexto ligando (Piontek *et al.*, 1993; Glenn y Gold, 1985; Smulevich, 1998). Los espectros de absorción de la VP de *P. eryngii* y de *B. adusta* UAMH 7308, presentan bandas α y β más evidentes que

en el caso del anamorfo (características de Fe^{3+} en estado de bajo spin), mientras que la banda Soret, CT1 y CT2 son similares (Pérez-Boada *et al.*, 2005; Ayala-Aceves *et al.*, 2001). Los estudios realizados con la VP de *B. adusta* UAMH 7308, indicaron que su Fe^{3+} está predominantemente hexacoordinado en estado de alto spin, pero se ha detectado un porcentaje de bajo spin (Ayala-Aceves *et al.*, 2001).

El ϵ_{408} de la MnP1 y la MnP2 del anamorfo (115 y 123 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente) es comparable al de la MnP de *P. chrysosporium* ($\epsilon_{406} = 129,3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Glenn y Gold, 1985) y al de la VP de *Bjerkandera* sp. BOS55 y de *P. eryngii* ($\epsilon_{407} = 123$ y $\epsilon_{406} = 150 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente) (Mester y Field, 1998; Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999). Se ha descrito que la relación A_{408}/A_{280} refleja la pureza de las hemoproteínas y sus propiedades espectroscópicas. Como las VP de *P. eryngii* y algunas *Bjerkandera* spp., las MnP del anamorfo presentaron un valor próximo a 4, lo que sugiere la presencia de dos Trp en su secuencia (Martínez *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2002).

4.4.3. Especificidad de sustrato

Como se ha mencionado anteriormente, las peroxidasas purificadas de los cultivos del anamorfo de *B. adusta* se clasificaron en el grupo de las MnP, en base a su especificidad de sustrato. Ambas isoenzimas oxidan eficientemente Mn^{2+} (K_m 40 y 50 μM), pero no presentan actividad sobre los compuestos de alto potencial redox alcohol veratrílico y RB5 (sustratos oxidados por las VP). Además, la MnP1 y la MnP2 del anamorfo presentan una afinidad extremadamente baja por el DMP (K_m 614 y 249 mM, respectivamente) y por el ABTS (K_m 10 y 3 mM, respectivamente). Las MnP de *P. chrysosporium*, PCH4, PCH5 y PCH6, presentaron por el Mn^{2+} una afinidad comparable a la de las MnP del anamorfo de *B. adusta* (K_m 15,6, 17,5 y 45,0 μM , respectivamente) (Palma *et al.*, 2000). En el caso de las VP de otras cepas de teleomorfos de *Bjerkandera* spp., se obtuvieron valores de K_m similares con MnSO_4 (17-86 μM), pero considerablemente inferiores con DMP (41-180 μM) (Palma *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2002; Mester y Field, 1998; Heinfling *et al.*, 1998a).

Finalmente cabe destacar, que las MnP, secretadas por el anamorfo de *B. adusta*, son las primeras MnP purificadas y caracterizadas en una especie del género *Bjerkandera*. El hallazgo de MnP, en este género, es consistente con la amplia distribución de este tipo de peroxidasas entre los hongos ligninolíticos, según han descrito otros autores (Hofrichter, 2002).

5. CONCLUSIONES

1. La especie fúngica, aislada del CD de Belice, es un anamorfo de *B. adusta*, según su morfología, la secuencia de la región ITS de su ADN_r y las enzimas ligninolíticas que secreta. Este hongo es capaz de colonizar *in vitro* diferentes CD, produciendo un patrón de degradación similar al del CD de Belice y deteriorando los principales componentes de los discos ópticos (policarbonato, colorante y metal). En la degradación de estos materiales podrían participar las oxidoreductasas y esterasas, secretadas por el anamorfo de *B. adusta*, directamente o mediante la formación de diferentes oxidantes difusibles. Además, este hongo secreta ácidos orgánicos que también podrían estar implicados en este proceso de degradación.

2. La oxidasa purificada, de los cultivos del anamorfo de *B. adusta*, es una glicoproteína monomérica con una molécula de FAD, unida de forma no covalente. Esta flavoenzima oxida eficientemente una amplia variedad de alcoholes primarios poliinsaturados a sus correspondientes aldehídos, reduciendo el O₂ a H₂O₂. Además, esta proteína cataliza la oxidación de aldehídos aromáticos, probablemente tras la hidratación espontánea de estos compuestos en solución. A diferencia de la mayoría de oxidasas dependientes de flavina, la oxidasa del anamorfo de *B. adusta* no estabiliza la semiquinona aniónica del cofactor y sólo forma un aducto con sulfito a concentraciones extremadamente elevadas de este anión. Las propiedades fisicoquímicas, espectroscópicas y catalíticas, de esta oxidasa, coinciden con las de la AAO de *P. eryngii*, aunque la afinidad de la nueva oxidasa por los alcoholes bencílicos clorados y por los aldehídos es superior.

3. La oxidasa del hongo aislado del CD también se diferencia de la AAO de *P. eryngii* en que presenta una afinidad más elevada por los alcoholes *para*-hidroxilados, que son sustratos de la vainillil-alcohol oxidasa, una flavoenzima con propiedades fisicoquímicas diferentes, que participa además en reacciones de desmetilación, hidroxilación y desaminación de compuestos aromáticos. Estas reacciones no son catalizadas por la oxidasa del anamorfo de *B. adusta* pero todos los compuestos testados como sustratos, en estos ensayos, se pueden unir a su centro activo aunque algunos de ellos no son alcoholes. Además de estos compuestos, los alcoholes alifáticos saturados también pueden unirse al centro activo de la nueva oxidasa pero tampoco son sustratos de esta enzima.

4. La velocidad de oxidación de los alcoholes bencílicos, catalizada por la oxidasa del hongo aislado del CD, es superior con los sustratos que incluyen sustituyentes dadores de electrones en posición *para* y esto sugiere que esta enzima no estabiliza un intermediario alcóxido durante su reducción. Las fuerzas

de dispersión también incrementan la velocidad de la reacción, catalizada por esta oxidasa, con los alcoholes *meta*- y *para*-sustituidos. Los grupos voluminosos, en posición *meta*, disminuyen su afinidad y las interacciones hidrofóbicas favorecen la unión de los sustratos *meta*- y *para*-sustituidos. Esto último indica que la oxidasa del anamorfo de *B. adusta* presenta un bolsillo de unión apolar en su centro activo. Su mecanismo cinético depende de la naturaleza del sustrato reductor, es secuencial con el sustrato que favorece más eficazmente las fuerzas de dispersión y de tipo *ping-pong* con los demás. Sin embargo, con todos los alcoholes testados es clave en la catálisis un residuo desprotonado y otro protonado y el pH óptimo de la enzima es próximo a 6,0.

5. La secuencia aminoacídica de la oxidasa del anamorfo de *B. adusta* incluye los 4 motivos conservados en la familia GMC de oxidorreductasas, así como los dos residuos conservados en el centro catalítico de estas proteínas (His e His/Asn) y, además, el modelo molecular, de esta oxidasa, presenta la topología característica de los miembros de esta familia. Estos resultados indican inequívocamente que la oxidasa del anamorfo de *B. adusta* es una nueva AAO en la familia GMC de oxidorreductasas. Esta nueva AAO tiene una identidad de secuencia significativa con la AAO de *P. eryngii*, pero algunos residuos de sus centros activos no coinciden y éstos podrían determinar su diferente especificidad de sustrato.

6. Las dos peroxidasas, purificadas de los cultivos del anamorfo de *B. adusta*, son glicoproteínas monoméricas con espectros de absorción, en estado de reposo, similares a los de otras peroxidasas que incluyen un grupo hemo con hierro férrico predominantemente de alto spin y hexacoordinado. Ambas peroxidasas oxidan eficazmente MnSO_4 , presentan una afinidad extremadamente baja por ABTS y DMP y no catalizan la oxidación de veratrílico y RB5. Estos resultados indican que estas peroxidasas pertenecen al grupo de las MnP, enzimas que requieren Mn^{2+} para completar su ciclo catalítico. Cabe destacar que este estudio describe, por primera vez, la purificación y caracterización de MnP en una cepa del género *Bjerkandera* y que la secuencia de sus extremos N-terminales no coincide con el de ninguna peroxidasa estudiada previamente.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alcalde, M. (2007). Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. En: Industrial enzymes. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 461-476.
- Arantes, V., Qian, Y., Kelley, S. S., Milagres, A. M., Filley, T. R., Jellison, J. y Goodell, B. (2009). Biomimetic oxidative treatment of spruce wood studied by pyrolysis-molecular beam mass spectrometry coupled with multivariate analysis and ^{13}C -labeled tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis: implications for fungal degradation of wood. *J. Biol. Inorg. Chem.* 14: 1253-1263.
- Archibald, F. S. (1992). A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure-B. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3110-3116.
- Artham, T. y Doble, M. (2008). Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates. *Macromol. Biosci.* 8: 14-24.
- Artham, T. y Doble, M. (2009). Fouling and degradation of polycarbonate in seawater: field and lab studies. *J. Polym. Environ.* 17: 170-180.
- Artham, T. y Doble, M. (2010). Biodegradation of physicochemically treated polycarbonate by fungi. *Biomacromolecules.* 11: 20-28.
- Artham, T., Sudhakar, M., Venkatesan, R., Nair, C. M., Murty, K. V. G. K. y Doble, M. (2009). Biofouling and stability of synthetic polymers in sea water. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63: 884-890.
- Asada, Y., Watanabe, A., Ohtsu, Y. y Kuwahara, M. (1995). Purification and characterization of an aryl-alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 1339-1341.
- Ayala, M., Pickard, M. A. y Vázquez-Duhalt, R. (2008). Fungal enzymes for environmental purposes, a molecular biology challenge. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15: 172-180.
- Ayala-Aceves, M., Baratto, M. C., Basosi, R., Vázquez-Duhalt, R. y Pogni, R. (2001). Spectroscopic characterization of a manganese-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera adusta* in the absence of manganese: evidence of a protein centred radical by hydrogen peroxide. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 16: 159-167.
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 91
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 215-242.
- Baldrian, P., Valaskova, V., Merhautova, V. y Gabriel, J. (2005). Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Res. Microbiol.* 156: 670-676.

- Ballance, D. J. (1986). Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* 2: 229-236.
- Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *J. Biotechnol.* 53: 253-263.
- Bannwarth, M., Bastian, S., Heckmann-Pohl, D., Giffhorn, F. y Schulz, G. E. (2004). Crystal structure of pyranose 2-oxidase from the white-rot fungus *Peniophora* sp. *Biochemistry USA* 43: 11683-11690.
- Bannwarth, M., Heckmann-Pohl, D., Bastian, S., Giffhorn, F. y Schulz, G. E. (2006). Reaction geometry and thermostable variant of pyranose 2-oxidase from the white-rot fungus *Peniophora* sp. *Biochemistry* 45: 6587-6595.
- Barbosa, J. A., Sivaraman, J., Li, Y., Larocque, R., Matte, A., Schrag, J. D. y Cygler, M. (2002). Mechanism of action and NAD⁺-binding mode revealed by the crystal structure of L-histidinol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1859-1864.
- Barnett, H. L. y Hunter, B. B. (1998). Descriptions and illustrations of genera. En: *Illustrated genera of imperfect fungi*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. 68-69.
- Baron, R., Riley, C., Chenprakhon, P., Thotsaporn, K., Winter, R. T., *et al.* (2009). Multiple pathways guide oxygen diffusion into flavoenzyme active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 10603-10608.
- Barr, D. P. y Aust, S. D. (1994). Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28: A78-A87
- Bates, F. S., Fredrickson, G. H., Hucul, D. y Hahn, S. F. (2001). PCHE-based pentablock copolymers: evolution of a new plastic. *AIChE Journal* 47: 762-765.
- Bause, E. (1983). Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem. J.* 209: 331-336.
- Belcarz, A., Ginalska, G. y Kornilowicz-Kowalska, T. (2005). Extracellular enzyme activities of *Bjerkandera adusta* R59 soil strain, capable of daunomycin and humic acids degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 686-694.
- Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Blaudez, D. y Chalot, M. (2006). Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 254: 173-181.
- Bennetzen, J. L. y Hall, B. D. (1982). Codon selection in yeast. *J. Biol. Chem.* 257: 3026-3031.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. y Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28: 235-242.

- Bertrand, G. (1896). Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. Seances Acad. Sci. 123: 463-465.
- Binda, C., Li, M., Hubalek, F., Restelli, N., Edmondson, D. E. y Mattevi, A. (2003). Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 9750-9755.
- Birkett, D. (2002). The chemistry of optical discs. J. Chem. Educ. 79: 1081-1087.
- Blyth, A. W. (1879). LVI.-The composition of cows' milk in health and disease. J. Chem. Soc. 35: 530-539.
- Boerjan, W., Ralph, J. y Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol. 54: 519-546.
- Bonnarme, P. y Jeffries, T. W. (1990). Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. Appl. Environ. Microbiol. 56: 210-217.
- Bourbonnais, R. y Paice, M. G. (1988). Veratryl alcohol oxidases from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. Biochem. J. 255: 445-450.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Bright, H. J. y Gibson, Q. H. (1967). The oxidation of 1-deuterated glucose by glucose oxidase. J. Biol. Chem. 242: 994-1003.
- Bringer, S., Sprey, B. y Sahm, H. (1979). Purification and properties of alcohol oxidase from *Poria contigua*. Eur. J. Biochem. 101: 563-570.
- Brogioni, B., Biglino, D., Sinicropi, A., Reijerse, E. J., Giardina, P., Sannia, G., Lubitz, W., Basosi, R. y Pogni, R. (2008). Characterization of radical intermediates in laccase-mediator systems. A multifrequency EPR, ENDOR and DFT/PCM investigation. Phys. Chem. Chem. Phys. 10: 7284-7292.
- Brown, J. A., Alic, M. y Gold, M. H. (1991). Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. J. Bacteriol. 173: 4101-4106.
- Bruckmann, M., Termonia, A., Pasteels, J. M. y Hartmann, T. (2002). Characterization of an extracellular salicyl alcohol oxidase from larval defensive secretions of *Chrysomela populi* and *Phratora vitellinae* (Chrysomelina). Insect Biochem. Mol. Biol. 32: 1517-1523.
- Burke, N. S. y Crawford, D. L. (1998). Use of azo dye ligand chromatography for the partial purification of a novel extracellular peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 523-530.

- Byers, G. W., Gross, S. y Henrichs, P. M. (1976). Direct and sensitized photooxidation of cyanine dyes. *Photochem. Photobiol.* 23: 37-43.
- Cajthaml, T., Kresinova, Z., Svobodova, K. y Moder, M. (2009). Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75: 745-750.
- Calero-Rueda, O., Plou, F. J., Ballesteros, A., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (2002). Production, isolation and characterization of a sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. *BBA Proteins Proteomics* 1599: 28-35.
- Calvo, M. V., Plou, F. J., Pastor, E. y Ballesteros, A. (1995). Effect of chemical modification of isoenzymes A and B from *C. rugosa* on their activity and stability. *Biotechnol. Lett.* 17: 171-176.
- Camarero, S., Galletti, G. C. y Martínez, A. T. (1994). Preferential degradation of phenolic lignin-units by two white-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4509-4516.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, A. T., Romero, J., Gutiérrez, A. y del Río, J. C. (2007). Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1264-1271.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (2005). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1775-1784.
- Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (1999). Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. *J. Biol. Chem.* 274: 10324-10330.
- Cañas, A., Alcalde, M., Plou, F. J., Martínez, M. J., Martínez, A. T. y Camarero, S. (2007). Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environ. Sci. Technol.* 41: 2964-2971.
- Cappitelli, F. y Sorlini, C. (2005). From papyrus to compact disc: the microbial deterioration of documentary heritage. *Crit. Rev. Microbiol.* 31: 1-10.
- Cappitelli, F. y Sorlini, C. (2008). Microorganisms attack synthetic polymers in items representing our cultural heritage. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 564-569.
- Caragea, C., Sinapov, J., Silvescu, A., Dobbs, D. y Honavar, V. (2007). Glycosylation site prediction using ensembles of Support Vector Machine classifiers. *BMC Bioinformatics* 8: 438

- Catal, T., Liu, H. y Bermek, H. (2008). Selenium induces manganese-dependent peroxidase production by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* (Willdenow) P. Karsten. *Biological Trace Element Research* 123: 211-217.
- Cavener, D. R. (1992). GMC oxidoreductases. A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *J. Mol. Biol.* 223: 811-814.
- Charton, M. y Charton, B. I. (1979). Significance of "volume" and "bulk" parameters in quantitative structure-activity relationships. *J. Org. Chem.* 44: 2284-2288.
- Chen, F. y Dixon, R. A. (2007). Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnol.* 25: 759-761.
- Chen, L., Lyubimov, A. Y., Brammer, L., Vrielink, A. y Sampson, N. S. (2008). The binding and release of oxygen and hydrogen peroxide are directed by a hydrophobic tunnel in cholesterol oxidase. *Biochemistry* 47: 5368-5377.
- Copeland, R. A. (2000). Enzyme reactions with multiple substrates. En: *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* (Ed.: Copeland, R. A.). Wiley-VCH, Inc., NY. 350-366.
- Corbier, C., Della, S. F. y Branlant, G. (1992). A new chemical mechanism catalyzed by a mutated aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* 31: 12532-12535.
- Cord, B., Mücke, M. y Sichmann, E. (2006). Vacuum coating technology for optical data storage media. *Vacuum's Best* 18: 38-44.
- Couto, S. R. y Herrera, J. L. T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv.* 24: 500-513.
- Cripps, C., Bumpus, J. A. y Aust, S. D. (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1114-1118.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. y Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14: 1188-1190.
- Cullen, D. y Kersten, P. J. (2004). Enzymology and molecular biology of lignin degradation. En: *Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology* (Eds.: Brambl, R. y Marzluf, G. A.). Springer, Berlin. 249-273.
- Daniel, G., Volc, J., Filonova, L., Plihal, O., Kubatova, E. y Halada, P. (2007). Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H₂O₂ in brown rot decay of wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6241-6253.
- Daniel, G., Volc, J. y Kubatova, E. (1994). Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2524-2532.

- de Jong, E., Beuling, E. E., van der Zwan, R. P. y de Bont, J. A. M. (1990). Degradation of veratryl alcohol by *Penicillium simplicissimum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 420-425.
- de Jong, E., Cazemier, A. E., Field, J. A. y de Bont, J. A. M. (1994a). Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. Appl. Environ. Microbiol. 60: 271-277.
- de Jong, E., Field, J. A. y de Bont, J. A. M. (1994b). Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. FEMS Microbiol. Rev. 13: 153-188.
- de Jong, E., Field, J. A., Dings, J. A. F. M., Wijnberg, J. B. P. A. y de Bont, J. A. M. (1992a). De novo biosynthesis of chlorinated aromatics by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. Formation of 3-chloro-anisaldehyde from glucose. FEBS Lett. 305: 220-224.
- de Jong, E., Field, J. A., Spinnler, H. E., Wijnberg, J. B. P. A. y de Bont, J. A. M. (1994c). Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments. Appl. Environ. Microbiol. 60: 264-270.
- de Jong, E., van Berkel, W. J. H., van der Zwan, R. P. y de Bont, J. A. M. (1992b). Purification and characterization of vanillyl alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. A novel aromatic alcohol oxidase containing covalently bound FAD. Eur. J. Biochem. 208: 651-657.
- DeSa, R. J. (1972). Putrescine oxidase from *Micrococcus rubens*. Purification and properties of the enzyme. J. Biol. Chem. 247: 5527-5534.
- Draper, R. D. y Ingraham, L. L. (1968). A potentiometric study of the flavin semiquinone equilibrium. Arch. Biochem. Biophys. 125: 802-808.
- Dreveny, I., Andryushkova, A. S., Glieder, A., Gruber, K. y Kratky, C. (2009). Substrate binding in the FAD-dependent hydroxynitrile lyase from almond provides insight into the mechanism of cyanohydrin formation and explains the absence of dehydrogenation activity. Biochemistry 48: 3370-3377.
- Dreveny, I., Gruber, K., Glieder, A., Thompson, A. y Krastky, C. (2001). The hydroxynitrile lyase from almond: a lyase that looks like a oxidoreductase. Structure 9: 803-815.
- Dube, E., Shareck, F., Hurtubise, Y., Daneault, C. y Beauregard, M. (2008). Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79: 597-603.
- Dunford, H. B. (1999). Heme peroxidases. Wiley-VCH, New York.
- Dutton, M. V. y Evans, C. S. (1996). Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. Can. J. Microbiol. 42: 881-895.
- Dym, O. y Eisenberg, D. (2001). Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. Protein Sci. 10: 1712-1728.

- Emmelius, M., Pawlowski, G. y Vollmann, H. W. (1989). Materials for optical data storage. *Angew. Chem. Int. Ed.* 28: 1445-1600.
- Eriksson, K.-E. y Nishida, A. (1988). Methanol oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* 161: 322-328.
- Faison, B. D. y Kirk, T. K. (1983). Relationship between lignin degradation and production of reduced oxygen species by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1140-1145.
- Fan, F. y Gadda, G. (2005). On the catalytic mechanism of choline oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2067-2074.
- Fan, F., Germann, M. W. y Gadda, G. (2006). Mechanistic studies of choline oxidase with betaine aldehyde and its isosteric analogue 3,3-dimethylbutyraldehyde. *Biochemistry* 45: 1979-1986.
- Farmer, V. C., Henderson, M. E. K. y Russell, J. D. (1959). Reduction of certain aromatic acids to aldehydes and alcohols by *Polystictus versicolor*. *Biochim. Biophys. Acta* 35: 202-211.
- Farmer, V. C., Henderson, M. E. K. y Russell, J. D. (1960). Aromatic-alcohol-oxidase activity in the growth medium of *Polystictus versicolor*. *Biochem. J.* 74: 257-262.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fengel, D. y Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. De Gruyter, Berlin.
- Fernández, I. S., Ruiz-Dueñas, F. J., Santillana, E., Ferreira, P., Martínez, M. J., Martínez, A. T. y Romero, A. (2009). Novel structural features in the GMC family of oxidoreductases revealed by the crystal structure of fungal aryl-alcohol oxidase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 65: 1196-1205.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Martínez, A. T. y Medina, M. (2009). Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: a mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two alcohol substrates. *J. Biol. Chem.* 284: 24840-24847.
- Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Martínez, M. J., Jiménez-Barbero, J. y Martínez, A. T. (2010). Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 425: 585-593.
- Ferreira, P., Medina, M., Guillén, F., Martínez, M. J., van Berkel, W. J. H. y Martínez, A. T. (2005). Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochem. J.* 389: 731-738.

- Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (2004). Site-directed mutagenesis of aryl-alcohol oxidase supplying H₂O₂ for lignin biodegradation. Abs. 9th Intern. Conf. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Durban, South Africa, 10-14 October
- Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., van Berkel, W. J. H. y Martínez, A. T. (2006). Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an H₂O₂-producing ligninolytic enzyme. FEBS J. 273: 4878-4888.
- Fitzpatrick, P. F. (2001). Substrate dehydrogenation by flavoproteins. Acc. Chem. Res. 34: 299-307.
- Fitzpatrick, P. F. (2007). Insights into the mechanisms of flavoprotein oxidases from kinetic isotope effects. J. Labelled Comp. Radiopharm. 50: 1016-1025.
- Flournoy, D. S., Paul, J. A., Kirk, T. K. y Highley, T. L. (1993). Changes in the size and volume of pores in sweetgum wood during simultaneous rot by *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Holzforschung 47: 297-301.
- Fraaije, M. W. y Mattevi, A. (2000). Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. Trends Biochem. Sci. 25: 126-132.
- Fraaije, M. W., Pikkemaat, M. y van Berkel, W. J. H. (1997). Enigmatic gratuitous induction of the covalent flavoprotein vanillyl-alcohol oxidase in *Penicillium simplicissimum*. Appl. Environ. Microbiol 63: 435-439.
- Fraaije, M. W. y van Berkel, W. J. H. (1997). Catalytic mechanisms of the oxidative demethoxylation of 4-(methoxymethyl)phenol by vanillyl-alcohol oxidase. Evidence for formation of a *p*-quinone methide intermediate. J. Biol. Chem. 272: 18111-18116.
- Fraaije, M. W., van Berkel, W. J. H., Benen, J. A. E., Visser, J. y Mattevi, A. (1998). A novel oxidoreductase family sharing a conserved FAD-binding domain. Trends Biochem. Sci. 23: 206-207.
- Fraaije, M. W., van den Heuvel, R. H., van Berkel, W. J. y Mattevi, A. (1999). Covalent flavinylation is essential for efficient redox catalysis in vanillyl-alcohol oxidase. J. Biol. Chem. 274: 35514-35520.
- Fraaije, M. W., Veeger, C. y van Berkel, W. J. H. (1995). Substrate specificity of flavin-dependent vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. Evidence for the production of 4-hydroxycinnamyl alcohols from allylphenols. Eur. J. Biochem. 234: 271-277.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. y Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002.

- Furukawa, H., Wieser, M., Morita, H., Sugio, T. y Nagasawa, T. (1999). Purification and characterization of vanillyl-alcohol oxidase from *Byssoschlamys fulva* V107. J. Biosci. Bioeng. 87: 285-290.
- Gadda, G. (2003). Kinetic mechanism of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. Biochim. Biophys. Acta 1646: 112-118.
- Gadda, G. (2008). Hydride transfer made easy in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by flavin-dependent oxidases. Biochemistry 47: 13745-13753.
- Gallois, A., Gross, B., Langlois, D., Spinnler, H.-E. y Brunerie, P. (1990). Influence of culture conditions on production of flavour compounds by 29 ligninolytic basidiomycetes. Mycol. Res. 94: 494-504.
- García, E., Martínez, A. T., Martínez, M. J. y Alcalde, M. (2009). Functional expression of a ligninolytic peroxidase. Abs. Intern. Conf. Protein Stabilisation, Graz, April 14-17
- García-Guinea, J., Cárdenes, V., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (2001). Fungal bioturbation paths in a compact disk. Naturwissenschaften 88: 351-354.
- Ghanem, M., Fan, F., Francis, K. y Gadda, G. (2003). Spectroscopic and kinetic properties of recombinant choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. Biochemistry 42: 15179-15188.
- Ghanem, M. y Gadda, G. (2005). On the catalytic role of the conserved active site residue His466 of choline oxidase. Biochemistry 44: 893-904.
- Ghanem, M. y Gadda, G. (2006). Effects of reversing the protein positive charge in the proximity of the flavin N(1) locus of choline oxidase. Biochemistry 45: 3437-3447.
- Ghisla, S. y Massey, V. (1989). Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. Eur. J. Biochem. 181: 1-17.
- Ghisla, S., Massey, V., Lhoste, J. M. y Mayhew, S. G. (1974). Fluorescence and optical characteristics of reduced flavines and flavoproteins. Biochemistry 13: 589-597.
- Gianfreda, L., Xu, F. y Bollag, J.-M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediation Journal 3: 1-26.
- Gibson, Q. H., Swoboda, B. E. y Massey, V. (1964). Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. J. Biol. Chem. 239: 3927-3934.
- Glenn, J. K. y Gold, M. H. (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 242: 329-341.
- Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M. y Gold, M. H. (1983). An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the

- white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114: 1077-1083.
- Goetghebeur, M., Nicolas, M., Brun, S. y Galzy, P. (1992). Purification and properties of benzyl alcohol oxidase from *Botrytis cinerea*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56: 298-303.
- Gold, M. H. y Alic, M. (1993). Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiol. Rev. 57: 605-622.
- Gold, M. H., Youngs, H. L. y Gelpke, M. D. (2000). Manganese peroxidase. Met. Ions Biol. Syst. 37: 559-586.
- Gómez-Moreno, C. y Edmondson, D. E. (1985). Evidence for an aldehyde intermediate in the catalytic mechanism of thiamine oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 239: 46-52.
- Gómez-Toribio, V., García-Martín, A. B., Martínez, M. J., Martínez, A. T. y Guillén, F. (2009a). Enhancing the production of hydroxyl radicals by *Pleurotus eryngii* via quinone redox cycling for pollutant removal. Appl. Environ. Microbiol. 75: 3954-3962.
- Gómez-Toribio, V., García-Martín, A. B., Martínez, M. J., Martínez, A. T. y Guillén, F. (2009b). Induction of extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi through quinone redox cycling. Appl. Environ. Microbiol. 75: 3944-3953.
- Gondry, M., Dubois, J., Terrier, M. y Lederer, F. (2001). The catalytic role of tyrosine 254 in flavocytochrome b2 (L-lactate dehydrogenase from baker's yeast). Comparison between the Y254F and Y254L mutant proteins. Eur. J. Biochem. 268: 4918-4927.
- González, R., Ramón, D. y Pérez González, J. A. (1992). Cloning, sequencing analysis and yeast expression of the *egl1* gene from *Trichoderma longibrachiatum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 370-378.
- Grubmeyer, C. T., Chu, K. W. y Insinga, S. (1987). Kinetic mechanism of histidinol dehydrogenase: histidinol binding and exchange reactions. Biochemistry 26: 3369-3373.
- Guillén, F. y Evans, C. S. (1994). Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2811-2817.
- Guillén, F., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (1990). Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 465-469.
- Guillén, F., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (1992). Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Eur. J. Biochem. 209: 603-611.

- Guillén, F., Martínez, A. T., Martínez, M. J. y Evans, C. S. (1994). Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 465-470.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (1994). Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1783-1788.
- Gutiérrez, A., del Río, J. C. y Martínez, A. T. (2009). Microbial and enzymatic control of pitch in the pulp and paper industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 1005-1018.
- Gutiérrez, A., del Río, J. C., Rencoret, J., Ibarra, D., Speranza, A. M., Camarero, S., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (2006). Sistema enzima-mediador para el control de los depósitos de *pitch* en la fabricación de pasta y papel. Patent (International) PCT/ES06/070091.
- Gutiérrez, A., del Río, J. C., Rencoret, J., Ibarra, D., Speranza, A. M., Camarero, S., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (2008). Mediator-enzyme system for controlling pitch deposits in pulp and paper production. Patent (USA), 10080210393/Patent (European) EP 1 908 876 A1.
- Hage, A., Schoemaker, H. E. y Field, J. A. (1999). Reduction of aryl acids by white-rot fungi for the biocatalytic production of aryl aldehydes and alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 834-838.
- Hallberg, B. M., Henriksson, G., Pettersson, G. y Divne, C. (2002). Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 315: 421-434.
- Hallberg, B. M., Henriksson, G., Pettersson, G., Vasella, A. y Divne, C. (2003). Mechanism of the reductive half-reaction in cellobiose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 278: 7160-7166.
- Hallberg, B. M., Leitner, C., Haltrich, D. y Divne, C. (2004). Crystal structure of the 270 kDa homotetrameric lignin-degrading enzyme pyranose 2-oxidase. *J. Mol. Biol.* 341: 781-796.
- Hammel, K. E., Mozuch, M. D., Jensen, K. A. y Kersten, P. J. (1994). H₂O₂ recycling during oxidation of the arylglycerol b-aryl ether lignin structure by lignin peroxidase and glyoxal oxidase. *Biochemistry* 33: 13349-13354.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hansch, C. y Leo, A. (1979). Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. Wiley-Interscience, New York.
- Hansen, E. H., Moller, B. L., Kock, G. R., Bunner, C. M., Kristensen, C., *et al.* (2009). De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2765-2774.

- Hardman, M. J., Blackwell, L. F., Boswell, C. R. y Buckley, P. D. (1974). Substituent effects on the pre-steady-state kinetics of oxidation of benzyl alcohols by liver alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 50: 113-118.
- Hartmann, C. y Klinman, J. P. (1991). Structure-function studies of substrate oxidation by bovine serum amine oxidase: relationship to cofactor structure and mechanism. *Biochemistry* 30: 4605-4611.
- Harvey, P. J., Schoemaker, H. E. y Palmer, J. M. (1986). Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 195: 242-246.
- Hassan-Abdallah, A., Bruckner, R. C., Zhao, G. H. y Jorns, M. S. (2005). Biosynthesis of covalently bound flavin: isolation and *in vitro* flavinylation of the monomeric sarcosine oxidase apoprotein. *Biochemistry* 44: 6452-6462.
- Hatakka, A. (2001). Biodegradation of lignin. En: *Biopolymers. Biology, Biotechnology, Applications*. Vol. 1. Lignin, Humic substances and coal (Eds.: Hofrichter, M. y Steinbüchel, A.). Wiley-VCH, Weinheim. 129-180.
- Hecht, H. J., Kalisz, H. M., Hendle, J., Schmid, R. D. y Schomburg, D. (1993). Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 229: 153-172.
- Heinfling, A., Bergbauer, M. y Szewzyk, U. (1997). Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 261-266.
- Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M. y Szewzyk, U. (1998a). Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol. Lett.* 165: 43-50.
- Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M. y Szewzyk, U. (1998b). Transformation of industrial dyes by manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2788-2793.
- Heinfling, A., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., Bergbauer, M., Szewzyk, U. y Martínez, A. T. (1998c). A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Lett.* 428: 141-146.
- Heinfling-Weidtmann, A., Reemtsma, T., Storm, T. y Szewzyk, U. (2001). Sulfophthalimide as major metabolite formed from sulfonated phthalocyanine dyes by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol. Lett.* 203: 179-183.

- Hemmerich, P. y Massey, V. (1977). Flavin and 5-deazaflavin: a chemical evaluation of 'modified' flavoproteins with respect to the mechanisms of redox biocatalysis. *FEBS Lett.* 84: 5-21.
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., Martínez, M. J., Romero, A. y Martínez, A. T. (2008). Discriminating the role of His502 and His546 in aryl-alcohol oxidase catalysis. *Proc. Intern. Symp. Flavins and Flavoproteins*, Jaca, 8-13 June
- Heuts, D. P., Scrutton, N. S., McIntire, W. S. y Fraaije, M. W. (2009). What's in a covalent bond? On the role and formation of covalently bound flavin cofactors. *FEBS J.* 276: 3405-3427.
- Higuchi, T. (1990). Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24: 23-63.
- Hildén, L., Johansson, G., Pettersson, G., Li, J., Ljungquist, P. y Henriksson, G. (2000). Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation? *FEBS Lett.* 477: 79-83.
- Hirano, T., Honda, Y., Watanabe, T. y Kuwahara, M. (2000). Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1958-1962.
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* 30: 454-466.
- Hofrichter, M., Bublit, F. y Fritsche, W. (1997). Fungal attack on coal II. Solubilization of low-rank coal by filamentous fungi. *Fuel Processing Technology* 52: 55-64.
- Hol, W. G., van Duijnen, P. T. y Berendsen, H. J. (1978). The α -helix dipole and the properties of proteins. *Nature* 273: 443-446.
- Holm, L. y Park, J. (2000). DaliLite workbench for protein structure comparison. *Bioinformatics* 16: 566-567.
- Hopewell, J., Dvorak, R. y Kosior, E. (2009). Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 364: 2115-2126.
- Huang, F., Wu, Y., Gu, D. y Gan, F. (2005). Optical parameters and absorption of copper (II)-azo complexes thin films as optical recording media. *Thin Solid Films* 483: 251-256.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., Cuche, B. A., de Castro, E., Lachaize, C., Langendijk-Genevaux, P. S. y Sigrist, C. J. (2008). The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 36: D245-D249
- Husain, Q. (2006). Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 26: 201-221.

- Husain, Q. (2010). Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* (En prensa).
- Iiyama, K., Lam, T. B. T. y Stone, B. A. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* 104: 315-320.
- Iizuka, T. y Yonetani, T. (1970). Spin changes in hemoproteins. *Adv. Biophys.* 1: 157-182.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- International Union of Biochemistry. (1965). Enzyme units. En: *Enzyme nomenclature. Report on the recommendations (1964) of the International Union of Biochemistry on the nomenclature and classification of enzymes.* Elsevier, Amsterdam, London, New York. 6-10.
- Iwahara, S., Nishihira, T., Jomori, T., Kuwahara, M. y Higuchi, T. (1980). Enzymic oxidation of α,β -unsaturated alcohols in the side chains of lignin-related aromatic compounds. *J. Ferment. Technol.* 58: 183-188.
- Jarosz-Wilkolazka, A. y Gadd, G. M. (2003). Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended medium. *Chemosphere* 52: 541-547.
- Jin, J. F., Mazon, H., van den Heuvel, R. H. H., Janssen, D. B. y Fraaije, M. W. (2007). Discovery of a eugenol oxidase from *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *FEBS J.* 274: 2311-2321.
- Kaal, E. E. J., de Jong, E. y Field, J. A. (1993). Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4031-4036.
- Kaempf, G. (1987). Special polymers for data memories. *Polymer Journal* 19: 257-268.
- Kamitsuji, H., Watanabe, T., Honda, Y. y Kuwahara, M. (2005). Direct oxidation of polymeric substrates by multifunctional manganese peroxidase isozyme from *Pleurotus ostreatus* without redox mediators. *Biochem. J.* 386: 387-393.
- Kapich, A. N., Korneichik, T. V., Hatakka, A. y Hammel, K. E. (2010). Oxidizability of unsaturated fatty acids and of a non-phenolic lignin structure in the manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation system. *Enzyme Microb. Technol.* 46: 136-140.
- Karrer, P., Schöpp, K. y Benz, F. (1935). Synthesen von Flavinen IV. *Helvetica Chim. Acta* 18: 426-429.
- Kass, I. J. y Sampson, N. S. (1998a). Evaluation of the role of His447 in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *Biochemistry* 37: 17990-18000.

- Kass, I. J. y Sampson, N. S. (1998b). The importance of GLU361 position in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 2663-2668.
- Kato, N., Omori, Y., Tani, Y. y Ogata, K. (1976). Alcohol oxidases of *Kloeckera* sp. and *Hansenula polymorpha*. Catalytic properties and subunit structures. *Eur. J. Biochem.* 64: 341-350.
- Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M., Higuchi, T., Koide, K., Nishida, T., Morohoshi, N. y Haraguchi, T. (1987). C_a-C_b cleavage of phenolic b-1 lignin substructure model compound by laccase of *Coriolus versicolor*. *Mokuzai Gakkaishi* 33: 792-797.
- Kelley, R. L. y Reddy, C. A. (1986a). Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 144: 248-253.
- Kelley, R. L. y Reddy, C. A. (1986b). Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 166: 269-274.
- Kersten, P. y Cullen, D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genet. Biol.* 44: 77-87.
- Kersten, P. J. y Kirk, T. K. (1987). Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169: 2195-2201.
- Kiess, M., Hecht, H. J. y Kalisz, H. M. (1998). Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. *Eur. J. Biochem.* 252: 90-99.
- Kim, S. J. y Shoda, M. (1999). Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1029-1035.
- Kim, S. J., Suzuki, N., Uematsu, Y. y Shoda, M. (2001). Characterization of aryl alcohol oxidase produced by dye-decolorizing fungus, *Geotrichum candidum* Dec1. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 166-172.
- Kimura, Y., Asada, Y. y Kuwahara, M. (1990). Screening of basidiomycetes for lignin peroxidase genes using a DNA probe. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 436-442.
- Kirk, T. K. y Cullen, D. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. En: *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry* (Eds.: Young, R. A. y Akhtar, M.). TAPPI Press, Atlanta. 273-308.
- Kirk, T. K. y Farrell, R. L. (1987). Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.

- Klinman, J. P. (1976). Isotope effects and structure-reactivity correlations in the yeast alcohol dehydrogenase reaction. A study of the enzyme-catalyzed oxidation of aromatic alcohols. *Biochemistry* 15: 2018-2026.
- Ko, H. S., Yokoyama, Y., Ohno, N., Okadome, M., Amachi, S., Shinoyama, H. y Fujii, T. (2005). Purification and characterization of intracellular and extracellular, thermostable and alkali-tolerant alcohol oxidases produced by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus* NBRC 31693. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 348-353.
- Kondo, T., Morikawa, Y. y Hayashi, N. (2008). Purification and characterization of alcohol oxidase from *Paecilomyces variotii* isolated as a formaldehyde-resistant fungus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 995-1002.
- Kornilowicz-Kowalska, T., Wrzosek, M., Ginalska, G., Iglík, H. y Bancerz, R. (2006). Identification and application of a new fungal strain *Bjerkandera adusta* R59 in decolorization of daunomycin wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 583-590.
- Kuan, I. C. y Tien, M. (1993). Stimulation of Mn-peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1242-1246.
- Kuhn, R., Reinemund, K. y Weygand, F. (1934). Synthese des lumi-lactoflavins. *Chem. Ber.* 67: 1460-1462.
- Kujawa, M., Ebner, H., Leitner, C., Hallberg, B. M., Prongjit, M., *et al.* (2006). Structural basis for substrate binding and regioselective oxidation of monosaccharides at C3 by pyranose 2-oxidase. *J. Biol. Chem.* 281: 35104-35115.
- Kumar, A. K. y Goswami, P. (2008). Purification and properties of a novel broad substrate specific alcohol oxidase from *Aspergillus terreus* MTCC 6324. *Biochim. Biophys. Acta* 1784: 1552-1559.
- Kupfer, D. M., Drabenstot, S. D., Buchanan, K. L., Lai, H., Zhu, H., Dyer, D. W., Roe, B. A. y Murphy, J. W. (2004). Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryot. Cell* 3: 1088-1100.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. y Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169: 247-250.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- Langley, K. E., Villarejo, M. R., Fowler, A. V., Zamenhof, P. J. y Zabin, I. (1975). Molecular basis of β -galactosidase α -complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1254-1257.

- Large, A. T. y Connock, M. J. (1993). Aromatic alcohol oxidase and aldehyde oxidase activities in the digestive gland of three species of terrestrial gastropod (*Helix aspersa*, *Ario ater* and *Limax flavus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 104B: 489-491.
- Lario, P. I., Sampson, N. y Vrielink, A. (2003). Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: what atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity. *J. Mol. Biol.* 326: 1635-1650.
- Laskowski, R. A. (2009). PDBsum new things. *Nucleic Acids Res.* 37: D355-D359
- Lee, S. M., Koo, B. W., Choi, J. W., Choi, D. H., An, B. S., Jeung, E. B. y Choi, I. G. (2005). Degradation of bisphenol A by white rot fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 201-207.
- Leferink, N. G., Heuts, D. P., Fraaije, M. W. y van Berkel, W. J. (2008a). The growing VAO flavoprotein family. *Arch. Biochem. Biophys.* 474: 292-301.
- Leferink, N. G., Jose, M. D., Van Den Berg, W. A. y van Berkel, W. J. (2009). Functional assignment of Glu386 and Arg388 in the active site of L-galactono- γ -lactone dehydrogenase. *FEBS Lett.* 583: 3199-3203.
- Leferink, N. G., Van Den Berg, W. A. y van Berkel, W. J. (2008b). L-Galactono- γ -lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *FEBS J.* 275: 713-726.
- Leonowicz, A., Cho, N. S., Luterek, J., Wilkolazka, A., WojtasWasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D. y Rogalski, J. (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microb.* 41: 185-227.
- Li, J., Vrielink, A., Brick, P. y Blow, D. M. (1993). Crystal structure of cholesterol oxidase complexed with a steroid substrate: implications for flavin adenine dinucleotide dependent alcohol oxidases. *Biochemistry* 32: 11507-11515.
- Li, X., Wu, Y., Gu, D. y Gan, F. (2010). Spectral, thermal and optical properties of metal(II)-azo complexes for optical recording media. *Dyes and Pigments* 86: 182-189.
- Liers, C., Bobeth, C., Pecyna, M., Ullrich, R. y Hofrichter, M. (2010). DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1869-1879.
- Lim, L. W., Shamala, N., Mathews, F. S., Steenkamp, D. J., Hamlin, R. y Xuong, N. h. (1986). Three-dimensional structure of the iron-sulfur flavoprotein trimethylamine dehydrogenase at 2.4-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 261: 15140-15146.
- Lin, C.-H., Lin, H.-Y., Liao, W.-Z. y Dai, S. A. (2007). Novel chemical recycling of polycarbonate (PC) waste into bis-hydroxyalkyl ethers of bisphenol A for use as PU raw materials. *Green Chem.* 9: 38-43.

- Lindqvist, Y. y Branden, C. I. (1989). The active site of spinach glycolate oxidase. *J. Biol. Chem.* 264: 3624-3628.
- López, C. y Cavaco-Paulo, A. (2008). In-situ enzymatic generation of hydrogen peroxide for bleaching purposes. *Eng. Life Sci.* 8: 315-323.
- Lyubimov, A. Y., Chen, L., Sampson, N. S. y Vrielink, A. (2009). A hydrogen-bonding network is important for oxidation and isomerization in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 65: 1222-1231.
- Lyubimov, A. Y., Lario, P. I., Moustafa, I. y Vrielink, A. (2006). Atomic resolution crystallography reveals how changes in pH shape the protein microenvironment. *Nat. Chem. Biol.* 2: 259-264.
- Macheroux, P. (1999). UV-Visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins. En: *Flavoprotein protocols*. Humana Press, Totowa, USA. 1-7.
- Machida, Y. y Nakanishi, T. (1984). Purification and properties of pyranose oxidase from *Coriolus versicolor*. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2463-2470.
- Marchal, S. y Branlant, G. (1999). Evidence for the chemical activation of essential Cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry* 38: 12950-12958.
- Martin, F., Aerts, A., Ahren, D., Brun, A., Danchin, E. G., *et al.* (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452: 88-92.
- Martin, F., Rubini, P., Côté, R. y Kottke, I. (1994). Aluminium polyphosphate complexes in the mycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: a ^{27}Al -nuclear magnetic resonance study. *Planta* 194: 241-246.
- Martínez, A. T. (2002). Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 425-444.
- Martínez, A. T., Camarero, S., Guillén, F., Gutiérrez, A., Muñoz, C., *et al.* (1994). Progress in biopulping of non-woody materials: chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat-straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 265-274.
- Martínez, A. T., Rencoret, J., Marqués, G., Gutiérrez, A., Ibarra, D., Jiménez-Barbero, J. y del Río, J. C. (2008). Monolignol acylation and lignin structure in some nonwoody plants: a 2D NMR study. *Phytochemistry* 69: 2831-2843.
- Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A. y del Río, J. C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. *Intern. Microbiol.* 8: 195-204.

- Martínez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D. S., Schmoll, M., *et al.* (2009). Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 1954-1959.
- Martínez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F. y Martínez, A. T. (1996). Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 237: 424-432.
- Mason, M. G., Nicholls, P. y Wilson, M. T. (2003). Rotting by radicals – the role of cellobiose oxidoreductase? *Biochem. Soc. Trans.* 31: 1335-1336.
- Massey, V. (2000). The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 283-296.
- Massey, V. (2002). The reactivity of oxygen with flavoproteins. *Intern. C. Ser.* 1233: 3-11.
- Massey, V. y Hemmerich, P. (1980). Active-site probes of flavoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* 8: 246-257.
- Massey, V., Müller, F., Feldberg, R., Schuman, M., Sullivan, P. A., Howell, L. G., Mayhew, S. G., Matthews, R. G. y Foust, G. P. (1969). The reactivity of flavoproteins with sulfite. Possible relevance to the problem of oxygen reactivity. *J. Biol. Chem.* 244: 3999-4006.
- Massey, V. y Palmer, G. (1966). On the existence of spectrally distinct classes of flavoprotein semiquinones. A new method for the quantitative production of flavoprotein semiquinones. *Biochemistry* 5: 3181-3189.
- Matsuzaki, F., Shimizu, M. y Wariishi, H. (2008). Proteomic and metabolomic analyses of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* exposed to exogenous benzoic acid. *J. Proteome Res.* 7: 2342-2350.
- Mattevi, A. (1998). The PHBH fold: not only flavoenzymes. *Biophys. Chem.* 70: 217-222.
- Mattevi, A., Fraaije, M. W., Mozzarelli, A., Olivi, L., Coda, A. y van Berkel, W. J. H. (1997). Crystal structures and inhibitor binding in the octameric flavoenzyme vanillyl-alcohol oxidase: the shape of the active-site cavity controls substrate specificity. *Structure* 5: 907-920.
- Mattevi, A., Vanoni, M. A., Todone, F., Rizzi, M., Teplyakov, A., Coda, A., Bolognesi, M. y Curti, B. (1996). Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7496-7501.
- Menon, V., Hsieh, C. T. y Fitzpatrick, P. F. (1995). Substituted alcohols as mechanistic probes of alcohol oxidase. *Bioorg. Chem.* 23: 42-53.

- Mester, T. y Field, J. A. (1997). Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. FEMS Microbiol. Lett. 155: 161-168.
- Mester, T. y Field, J. A. (1998). Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. J. Biol. Chem. 273: 15412-15417.
- Mester, T., Peña, M. y Field, J. A. (1996). Nutrient regulation of extracellular peroxidases in the white rot fungus, *Bjerkandera* sp. strain BOS55. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 778-784.
- Mester, T., Sierra-Alvarez, R. y Field, J. A. (1998). Peroxidase and aryl metabolite production by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 during solid state fermentation of lignocellulosic substrates. Holzforschung 52: 351-358.
- Mester, T., Swarts, H. J., Sole, S. R. I., de Bont, J. A. M. y Field, J. A. (1997). Stimulation of aryl metabolite production in the basidiomycete *Bjerkandera* sp. strain BOS55 with biosynthetic precursors and lignin degradation products. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1987-1994.
- Michalski, C., Mohagheghi, H., Nimtz, M., Pasteels, J. y Ober, D. (2008). Salicyl alcohol oxidase of the chemical defense secretion of two chrysomelid leaf beetles. Molecular and functional characterization of two new members of the glucose-methanol-choline oxidoreductase gene family. J. Biol. Chem. 283: 19219-19228.
- Mills, N. (2005). Engineering case studies. En: Plastics: microstructure and engineering applications. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Mino, Y., Wariishi, H., Blackburn, N. J., Loehr, T. M. y Gold, M. H. (1988). Spectral characterization of manganese peroxidase, an extracellular heme enzyme from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 263: 7029-7036.
- Miura, R. (2001). Versatility and specificity in flavoenzymes: control mechanisms of flavin reactivity. Chem. Rec. 1: 183-194.
- Mohorcic, M., Teodorovic, S., Golob, V. y Friedrich, J. (2006). Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths. Chemosphere 63: 1709-1717.
- Molina-Guijarro, J. M., Pérez, J., Munoz-Dorado, J., Guillén, F., Moya, R., Hernández, M. y Arias, M. E. (2009). Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. Int. Microbiol. 12: 13-21.
- Moreira, M. T., Mielgo, I., Feijoo, G. y Lema, J. M. (2000). Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of synthetic dyes. Biotechnol. Lett. 22: 1499-1503.
- Moreira, P. R., Bouillenne, F., Almeida-Vara, E., Malcata, E. X., Frère, J. M. y Duarte, J. C. (2006). Purification, kinetics and spectral characterisation of a new versatile peroxidase from a *Bjerkandera* sp. isolate. Enzyme Microb. Technol. 38: 28-33.

- Moreira, P. R., Duez, C., Dehareng, D., Antunes, A., Almeida-Vara, E., Frère, J. M., Malcata, F. X. y Duarte, J. C. (2005). Molecular characterisation of a versatile peroxidase from a *Bjerkandera* strain. *J. Biotechnol.* 118: 339-352.
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V. y Yaropolov, Y. I. (2007). Laccase-mediator systems and their applications: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43: 523-535.
- Muheim, A., Waldner, R., Leisola, M. S. A. y Fiechter, A. (1990). An extracellular aryl-alcohol oxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 204-209.
- Müller, F. y Massey, V. (1969). Flavin-sulfite complexes and their structures. *J. Biol. Chem.* 244: 4007-4016.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (1997). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2166-2174.
- Munteanu, F.-D., Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, A. T. y Cavaco-Paulo, A. (2008). Bioelectrochemical investigations of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*. *J. Electroanal. Chem.* 618: 83-86.
- Mustroph, H., Stollenwerk, M. y Bressau, V. (2006). Current developments in optical data storage with organic dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45: 2016-2035.
- Nejati, K., Rezvani, Z. y Seyedahmadian, M. (2009). The synthesis, characterization, thermal and optical properties of copper, nickel, and vanadyl complexes derived from azo dyes. *Dye and pigments* 83: 304-311.
- Niemenmaa, O., Uusi-Rauva, A. y Hatakka, A. (2008). Demethoxylation of [O¹⁴CH₃]-labelled lignin model compounds by the brown-rot fungi *Gloeophyllum trabeum* and *Poria (Postia) placenta*. *Biodegradation.* 19: 555-565.
- Nishida, A. y Eriksson, K.-E. (1987). Formation, purification, and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9: 325-338.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., *et al.* (2009). A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 364: 2047-2062.
- Okamoto, K., Narayama, S., Katsuo, A., Shigematsu, I. y Yanase, H. (2002). Biosynthesis of *p*-anisaldehyde by the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 207-210.
- Okamoto, K. y Yanase, H. (2002). Aryl alcohol oxidases from the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience* 43: 391-395.

- Olson, L. P., Luo, J., Almarsson, O. y Bruice, T. C. (1996). Mechanism of aldehyde oxidation catalyzed by horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 35: 9782-9791.
- Orth, A. B., Royse, D. J. y Tien, M. (1993). Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4017-4023.
- Orville, A. M., Lountos, G. T., Finnegan, S., Gadda, G. y Prabhakar, R. (2009). Crystallographic, spectroscopic, and computational analysis of a flavin C4a-oxygen adduct in choline oxidase. *Biochemistry* 48: 720-728.
- Palma, C., Martínez, A. T., Lema, J. y Martínez, M. J. (2000). Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: a comparison between *Bjerkandera* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 77: 235-245.
- Park, H., Kim, E.-R., Kim, D. J. y Lee, H. (2002). Synthesis of metal-azo dyes and their optical and thermal properties as recording materials for DVD-R. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 75: 2067-2070.
- Paszczynski, A. y Crawford, R. L. (1991). Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of veratryl alcohol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178: 1056-1063.
- Paszczynski, A., Pastigri, M. B., Goszczynski, S., Crawford, R. L. y Crawford, D. L. (1992). Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3598-3604.
- Patel, R. N., Hou, C. T., Laskin, A. I. y Derelanko, P. (1981). Microbial oxidation of methanol: properties of crystallized alcohol oxidase from a yeast, *Pichia* sp. *Arch. Biochem. Biophys.* 210: 481-488.
- Pease, E. A. y Tien, M. (1992). Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 174: 3532-3540.
- Peláez, F., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (1995). Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Micol. Res.* 99: 37-42.
- Pennati, A. y Gadda, G. (2009). Involvement of ionizable groups in catalysis of human liver glycolate oxidase. *J. Biol. Chem.* 284: 31214-31222.
- Pérez, J. y Jeffries, T. W. (1992). Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2402-2409.
- Pérez-Boada, M., Doyle, W. A., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., Martínez, A. T. y Smith, A. T. (2002). Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of *in vitro* folding. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 518-524.

- Pérez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M. J., Piontek, K. y Martínez, A. T. (2005). Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigations of three long-range electron transfer pathways. *J. Mol. Biol.* 354: 385-402.
- Pesole, G., Grillo, G., Larizza, A. y Liuni, S. (2000). The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis. *Brief. Bioinform.* 1: 236-249.
- Petrek, M., Otyepka, M., Banas, P., Kosinova, P., Koca, J. y Damborsky, J. (2006). CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics* 7: 316
- Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., *et al.* (2002). Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nature Biotechnol.* 20: 607-612.
- Pilone, M. S. (2000). D-Amino acid oxidase: new findings. *Cell Mol. Life Sci.* 57: 1732-1747.
- Piontek, K., Glumoff, T. y Winterhalter, K. (1993). Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett.* 315: 119-124.
- Pitsawong, W., Sucharitakul, J., Prongjit, M., Tan, T. C., Spadiut, O., Haltrich, D., Divne, C. y Chaiyen, P. (2010). A conserved active-site threonine is important for both sugar and flavin oxidations of pyranose 2-oxidase. *J. Biol. Chem.*
- Pogni, R., Baratto, M. C., Teutloff, C., Giansanti, S., Ruiz-Dueñas, F. J., *et al.* (2006). A tryptophan neutral radical in the oxidized state of versatile peroxidase from *Pleurotus eryngii*: a combined multi-frequency EPR and DFT study. *J. Biol. Chem.* 281: 9517-9526.
- Pollegioni, L., Blodig, W. y Ghisla, S. (1997). On the mechanism of D-amino acid oxidase. Structure/linear free energy correlations and deuterium kinetic isotope effects using substituted phenylglycines. *J. Biol. Chem.* 272: 4924-4934.
- Pollegioni, L., Wels, G., Pilone, M. S. y Ghisla, S. (1999). Kinetic mechanisms of cholesterol oxidase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Brevibacterium sterolicum*. *Eur. J. Biochem.* 264: 140-151.
- Quaye, O., Lountos, G. T., Fan, F., Orville, A. M. y Gadda, G. (2008). Role of Glu312 in binding and positioning of the substrate for the hydride transfer reaction in choline oxidase. *Biochemistry* 47: 243-256.
- Rainio, A., Majjala, P., Hildén, K. y Hatakka, A. (2008). A novel peroxidase from the white-rot fungus *Cerrena unicolor*. *Proc. Intern. Symp. Peroxidase, Tampere, 20-23 August*
- Rao, S. T. y Rossmann, M. G. (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *J. Mol. Biol.* 76: 241-256.

- Robinson, T., Chandran, B. y Nigam, P. (2001). Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 575-579.
- Rodakiewicz-Nowak, J., Jarosz-Wilkolazka, A. y Luterek, J. (2006). Catalytic activity of versatile peroxidase from *Bjerkandera fumosa* in aqueous solutions of water-miscible organic solvents. *Appl. Cat. A: General* 308: 56-61.
- Rodríguez, S. (2009). Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnol. Adv.* 27: 227-235.
- Rollet, F., Morlat-Thérias, S. y Gardette, J.-L. (2009). AFM analysis of CD-R photoageing. *Polym. Degr. Stab.* 94: 877-885.
- Romero, E., Ferreira, P., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (2009). New oxidase from *Bjerkandera* arthroconidial anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. *Biochim. Biophys. Acta* 1794: 689-697.
- Romero, E., Speranza, M., García-Guinea, J., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (2007). An anamorph of the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* capable of colonizing and degrading compact disc components. *FEMS Microbiol. Lett.* 275: 122-129.
- Rossmann, M. G., Moras, D. y Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* 250: 194-199.
- Roth, J. P. y Klinman, J. P. (2003). Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 62-67.
- Rotsaert, F. A. J., Hallberg, B. M., de Vries, S., Moenne-Loccoz, P., Divne, C., Renganathan, V. y Gold, M. H. (2003a). Biophysical and structural analysis of a novel heme b iron ligation in the flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 278: 33224-33231.
- Rotsaert, F. A. J., Renganathan, V. y Gold, M. H. (2003b). Role of the flavin domain residues, His689 and Asn732, in the catalytic mechanism of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 42: 4049-4056.
- Rowland, P., Bjornberg, O., Nielsen, F. S., Jensen, K. F. y Larsen, S. (1998). The crystal structure of *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function. *Protein Sci.* 7: 1269-1279.
- Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (2006). *In vitro* activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H₂O₂-producing enzyme. *Protein Expr. Purif.* 45: 191-199.
- Ruiz-Dueñas, F. J. y Martínez, A. T. (2009). Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology* 2: 164-177.

- Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (1999). Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* 31: 223-236.
- Ruiz-Dueñas, F. J., Morales, M., García, E., Miki, Y., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (2009a). Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J. Exp. Bot.* 60: 441-452.
- Ruiz-Dueñas, F. J., Morales, M., Mate, M. J., Romero, A., Martínez, M. J., Smith, A. T. y Martínez, A. T. (2008). Site-directed mutagenesis of the catalytic tryptophan environment in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase. *Biochemistry* 47: 1685-1695.
- Ruiz-Dueñas, F. J., Morales, M., Pérez-Boada, M., Choinowski, T., Martínez, M. J., Piontek, K. y Martínez, A. T. (2007). Manganese oxidation site in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase: a site-directed mutagenesis, kinetic and crystallographic study. *Biochemistry* 46: 66-77.
- Ruiz-Dueñas, F. J., Pogni, R., Morales, M., Giansanti, S., Mate, M. J., Romero, A., Martínez, M. J., Basosi, R. y Martínez, A. T. (2009b). Protein radicals in fungal versatile peroxidase: catalytic tryptophan radical in both compound I and compound II and studies on W164Y, W164H, and W164S variants. *J. Biol. Chem.* 284: 7986-7994.
- Rungsisuriyachai, K. y Gadda, G. (2008). On the role of histidine 351 in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by choline oxidase. *Biochemistry* 47: 6762-6769.
- Rungsisuriyachai, K. y Gadda, G. (2009). A pH switch affects the steady-state kinetic mechanism of pyranose 2-oxidase from *Trametes ochracea*. *Arch. Biochem. Biophys.* 483: 10-15.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sajiki, J. (2001). Decomposition of bisphenol-A (BPA) by radical oxygen. *Environ. Int.* 27: 315-320.
- Sajiki, J. y Yonekubo, J. (2002). Degradation of bisphenol-A (BPA) in the presence of reactive oxygen species and its acceleration by lipids and sodium chloride. *Chemosphere* 46: 345-354.
- Sakurai, A., Toyoda, S. y Sakakibara, M. (2001). Removal of bisphenol A by polymerization and precipitation method using *Coprinus cinereus* peroxidase. *Biotechnol. Lett.* 23: 995-998.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells. En: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 7.43-7.45
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001a). Appendix 2. En: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. A2.2

- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001b). Plasmids and their usefulness in molecular cloning. En: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York. 1.110-1.111
- Sampson, N. S. y Vrielink, A. (2003). Cholesterol oxidases: a study of nature's approach to protein design. *Acc. Chem. Res.* 36: 713-722.
- Sannia, G., Limongi, P., Cocca, E., Buonocore, F., Nitti, G. y Giardina, P. (1991). Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1073: 114-119.
- Sarkar, S., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (1997). Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1339: 23-30.
- Schulz, G. E. y Schirmer, R. H. (1974). Topological comparison of adenyl kinase with other proteins. *Nature* 250: 142-144.
- Senda, T., Senda, M., Kimura, S. y Ishida, T. (2009). Redox control of protein conformation in flavoproteins. *Antioxid. Redox. Signal.* 11: 1741-1766.
- Shyamala, V. y Ames, G. F. (1989). Genome walking by single-specific-primer polymerase chain reaction: SSP-PCR. *Gene* 84: 1-8.
- Sivalingam, G. y Madras, G. (2004). Dynamics of lipase catalyzed enzymatic degradation of poly(bisphenol-A carbonate). *J. Appl. Polym. Sci.* 91: 2391-2396.
- Slattery, O., Lu, R., Zheng, J., Byers, F. y Tang, X. (2004). Stability comparison of recordable optical discs-a study of error rates in harsh conditions. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 109: 517-524.
- Smith, A. T. y Veitch, N. C. (1998). Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 269-278.
- Smulevich, G. (1998). Understanding heme cavity structure of peroxidases: comparison of electronic absorption and resonance Raman spectra with crystallographic results. *Biospectroscopy* 4: S3-S17
- Sneh, B., Burpee, L. y Ogoshi, A. (1991). Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota.
- Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160: 61-73.
- Spadaro, J. T., Gold, M. H. y Renganathan, V. (1992). Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2397-2401.

- Spinnler, H. E., de Jong, E., Mauvais, G., Semon, E. y Le Quéré, J.-L. (1994). Production of halogenated compounds by *Bjerkandera adusta*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 212-221.
- Stajic, M., Vukojevic, J. y Duletic-Lausevic, S. (2009). Biology of *Pleurotus eryngii* and role in biotechnological processes: a review. Crit. Rev. Biotechnol. 29: 55-66.
- Stankovich, M. T., Schopfer, L. M. y Massey, V. (1978). Determination of glucose oxidase oxidation-reduction potentials and the oxygen reactivity of fully reduced and semiquinoid forms. J. Biol. Chem. 253: 4971-4979.
- Stolz, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 69-80.
- Sucharitakul, J., Prongjit, M., Haltrich, D. y Chaiyen, P. (2008). Detection of a C4a-hydroperoxyflavin intermediate in the reaction of a flavoprotein oxidase. Biochemistry 47: 8485-8490.
- Sugano, Y. (2009). DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. Cell Mol. Life Sci. 66: 1387-1403.
- Sugano, Y., Muramatsu, R., Ichianagi, A., Sato, T. y Shoda, M. (2007). DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family. J. Biol. Chem. 282: 36652-36658.
- Swamy, J. y Ramsay, J. A. (1999). The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. Enzyme Microb. Technol. 24: 130-137.
- Switzer, R. C., III, Merrill, C. R. y Shifrin, S. (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 98: 231-237.
- Swoboda, B. E. P. y Massey, V. (2001). On the reaction of the glucose oxidase from *Aspergillus niger* with bisulfite. J. Biol. Chem. 241: 3409-3416.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.
- Tarentino, L. A. y Maley, F. (1974). Purification and properties of an endo-b-N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*. J. Biol. Chem. 249: 811-817.
- ten Have, R., Hartmans, S., Teunissen, P. J. M. y Field, J. A. (1998). Purification and characterization of two lignin peroxidase isozymes produced by *Bjerkandera* sp. strain BOS55. FEBS Lett. 422: 391-394.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140: 19-26.
- Tien, M. y Kirk, T. K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science 221: 661-663.

- Tien, M. y Kirk, T. K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2280-2284.
- Tien, M. y Ma, D. (1997). Oxidation of 4-methoxymandelic acid by lignin peroxidase. Mediation by veratryl alcohol. J. Biol. Chem. 272: 8912-8917.
- Tinoco, R., Verdín, J. y Vázquez-Duhalt, R. (2007). Role of oxidizing mediators and tryptophan 172 in the decoloration of industrial dyes by the versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. J. Mol. Catal. B Enzym. 46: 1-7.
- Tonon, F. y Odier, E. (1988). Influence of veratryl alcohol and hydrogen peroxide on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 466-472.
- Trickey, P., Wagner, M. A., Jorns, M. S. y Mathews, F. S. (1999). Monomeric sarcosine oxidase: structure of a covalently flavinylated amine oxidizing enzyme. Structure 7: 331-345.
- Tsukamoto, K., Itakura, H., Sato, K., Fukuyama, K., Miura, S., Takahashi, S., Ikezawa, H. y Hosoya, T. (1999). Binding of salicylhydroxamic acid and several aromatic donor molecules to *Arthromyces ramosus* peroxidase, investigated by X-ray crystallography, optical difference spectroscopy, NMR relaxation, molecular dynamics, and kinetics. Biochemistry 38: 12558-12568.
- Tsutsumi, Y., Haneda, T. y Nishida, T. (2001). Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. Chemosphere 42: 271-276.
- Urzúa, U., Larrondo, L. F., Lobos, S., Larraín, J. y Vicuña, R. (1995). Oxidation reactions catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispora*. FEBS Lett. 371: 132-136.
- van den Heuvel, R. H., Fraaije, M. W., Mattevi, A. y van Berkel, W. J. (2000). Asp-170 is crucial for the redox properties of vanillyl-alcohol oxidase. J. Biol. Chem. 275: 14799-14808.
- Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., Kersten, P., Sabat, G., Martínez, D. y Cullen, D. (2009). Transcriptome and secretome analyses of *Phanerochaete chrysosporium* reveal complex patterns of gene expression. Appl. Environ. Microbiol. 75: 4058-4068.
- Varela, E., Böckle, B., Romero, A., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (2000a). Biochemical characterization, cDNA cloning and protein crystallization of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus pulmonarius*. Biochim. Biophys. Acta 1476: 129-138.
- Varela, E., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (1999). Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from the fungus *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. Biochem. J. 341: 113-117.

- Varela, E., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (2000b). Aryl-alcohol oxidase protein sequence: a comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1481: 202-208.
- Verhagen, F. J. M., Swarts, H. J., Wunberg, J. B. P. A. y Field, J. A. (1998). Organohalogen production is a ubiquitous capacity among basidiomycetes. *Chemosphere* 37: 2091-2104.
- Vrielink, A., Lloyd, L. F. y Blow, D. M. (1991). Crystal structure of cholesterol oxidase from *Brevibacterium sterolicum* refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219: 533-554.
- Wagner, M. A. y Jorns, M. S. (2000). Monomeric sarcosine oxidase: 2. Kinetic studies with sarcosine, alternate substrates, and a substrate analogue. *Biochemistry* 39: 8825-8829.
- Walker, M. C. y Edmondson, D. E. (1994). Structure-activity relationships in the oxidation of benzylamine analogues by bovine liver mitochondrial monoamine oxidase B. *Biochemistry* 33: 7088-7098.
- Wang, S., Shen, S., Xu, H., Gu, D., Yin, J. y Tang, X. (2000). Spectroscopic and optical properties of an azo-metal chelate dye as optical recording medium. *Mater. Sci. Eng. B* 76: 69-72.
- Wang, Y. X., Vázquez-Duhalt, R. y Pickard, M. A. (2002). Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Curr. Microbiol.* 45: 77-87.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. y Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22: 161-187.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (Eds.: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White T.J.). Academic Press, San Diego, California. 315-322.
- Whittaker, J. W. (2003). Free radical catalysis by galactose oxidase. *Chem. Rev.* 103: 2347-2364.
- Whittaker, M. M. y Whittaker, J. W. (2001). Catalytic reaction profile for alcohol oxidation by galactose oxidase. *Biochemistry* 40: 7140-7148.
- Wierenga, R. K., de Maeyer, M. C. H. y Hol, W. G. L. (1985). Interaction of pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide binding proteins. *Biochemistry* 24: 1346-1357.
- Wierenga, R. K., Terpstra, P. y Hol, W. G. L. (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding bab-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* 187: 101-107.
- Wirsal, S. G. R., Leibinger, W., Ernst, M. y Mendgen, K. (2001). Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. *New Phytologist* 149: 589-598.

- Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H. J. y Kalisz, H. M. (2000). Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of b-D-glucose. *Biochem. J.* 347: 553-559.
- Wohlfahrt, G., Trivic, S., Zeremski, J., Pericin, D. y Leskovac, V. (2004). The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Mol. Cell Biochem.* 260: 69-83.
- Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H. M. y Hecht, H.-J. (1999). 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidase as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr. D* 55: 969-977.
- Wong, D. W. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157: 174-209.
- Xia, Z. X. y Mathews, F. S. (1990). Molecular structure of flavocytochrome *b2* at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 212: 837-863.
- Xin, Y., Gadda, G. y Hamelberg, D. (2009). The cluster of hydrophobic residues controls the entrance to the active site of choline oxidase. *Biochemistry* 48: 9599-9605.
- Xu, X. R., Li, H. B., Wang, W. H. y Gu, J. D. (2004). Degradation of dyes in aqueous solutions by the Fenton process. *Chemosphere* 57: 595-600.
- Yelle, D. J., Ralph, J., Lu, F. y Hammel, K. E. (2008). Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. *Environ. Microbiol.* 10: 1844-1849.
- Yoon, N. M., Pak, C. S., Brown, H. C., Krishnamurthy, S. y Stocky, T. P. (1973). Selective reductions. XIX. The rapid reaction of carboxylic acids with borane-tetrahydrofuran. A remarkably convenient procedure for the selective conversion of carboxylic acids to the corresponding alcohols in the presence of other functional groups. *J. Org. Chem.* 38: 2786-2792.
- Yorita, K., Janko, K., Aki, K., Ghisla, S., Palfey, B. A. y Massey, V. (1997). On the reaction mechanism of L-lactate oxidase: quantitative structure-activity analysis of the reaction with *para*-substituted L-mandelates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9590-9595.
- Yorita, K., Misaki, H., Palfey, B. A. y Massey, V. (2000). On the interpretation of quantitative structure-function activity relationship data for lactate oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2480-2485.
- Yoshida, H. (1883). Chemistry of lacquer (*Urushi*). *J. Chem. Soc.* 43: 472-486.
- Yue, Q. K., Kass, I. J., Sampson, N. S. y Vrielink, A. (1999). Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants. *Biochemistry* 38: 4277-4286.

- Zámocký, M., Hallberg, M., Ludwig, R., Divne, C. y Haltrich, D. (2004). Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenases reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in fungi. *Gene* 338: 1-14.
- Zaret, K. S. y Sherman, F. (1982). DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell* 28: 563-573.
- Zevenhoven, R. y Saeed, L. (2002). Automotive shredder residue (ASR) and compact disc (CD) waste: options for recovery of materials and energy. Helsinki University of Technology. Protection publications, TKK-ENY-14.
- Zhao, J. y Kwan, H. S. (1999). Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4908-4913.
- Zouari-Mechichi, H., Mechichi, T., Dhouib, A., Sayadi, S., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (2006). Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 141-148.

